	<b>RADIOMARQUAGE DES LEUCOCYTES</b>	
		<b>Applicable le : 01/06/2022</b>
<b>Rédacteur / Approbateurs</b>		
N. VERAN		

## 1. OBJET :

Ce document décrit les modalités de réalisation d'un radiomarquage des leucocytes pour la réalisation d'une scintigraphie au sein du service de Médecine Nucléaire de Nancy.

## 2. CONTENU :

### Matériel et réactifs nécessaires :

#### Appareillage :

- Centrifugeuse
- Hotte à flux laminaire
- Chronomètre

#### Réactifs :

- Solution Hydro-Alcoolique
- Une poche de GELOFUSINE 4% 500mL (agent de sédimentation)
- Une poche de solution anticoagulante Acide Citrique Dextrose ACDA
- 4 flacons de NaCl 0,9% 10 mL
- 50 mL de sang veineux

#### Matériel :

##### -Pour la manipulation :

- 2 seringues de 50 mL embout Luer Lock (24553)
- 5 seringues de 5 mL (pour lavage au NaCl)
- 1 seringues de 1 mL (pour le marquage)
- 1 dispositif de prélèvement de taille 20G minimum (hors pédiatrie)
- Aiguilles de 18 G roses (3104)
- 3 tube Falcon 60 mL
- 2 prolongateurs pour raccorder la seringue de 60mL au tube Falcon (3060)
- 1 robinet 3 voies
- 1 trousse Ceretec® (15398)
- 2 socles pour les seringues de sédimentation

##### -Pour l'hygiène :

- Masque
- Gants stériles

##### -Pour la dosimétrie et la radioprotection

- Dosimètre passif
- Dosimètre actif
- Dosimètre bague
- Protège flacon, protège seringue, écrans

### Prélèvement et sédimentation

- Nettoyer la hotte à flux d'air laminaire
- Installer un champ stérile sur le plan de travail pour obtenir une zone propre.
- Ouvrir le conditionnement des seringues de 60 mL.
- Adapter une aiguille rose.
- Prélever 5 mL d'ACD à l'aide d'une aiguille rose dans chaque seringue de sédimentation de 60 mL.
- Amener les seringues en salle d'injection sur un plateau avec un robinet 3 voies
- Effectuer la préparation du patient pour le prélèvement. Adapter le robinet 3 voies sur le dispositif de prélèvement.
- Connecter le dispositif de prélèvement à l'embout de la seringue de sédimentation.
- Prélever 25 mL de sang veineux du patient dans chaque seringue de 60 mL Luer Lock contenant chacune 5 ml d'anticoagulant (ACDA).

- Prélever doucement et sans stress (éviter la formation de mousse ou de bulles) pour conserver l'intégrité des cellules.
- Retirer le dispositif de prélèvement
- Ramener les seringues dans la hotte à flux d'air laminaire.
- Prélever dans chaque seringue de sédimentation 6 mL de GELOFUSINE 4% à l'aide d'une aiguille rose.
- Homogénéiser avec précaution le mélange anticoagulant par une série de retournements successifs (pas d'agitation).
- Connecter le prolongateur sur le cône Luer de la seringue et positionner l'autre embout dans un tube Falcon stérile. Veiller à ce qu'il n'y ait pas de sang dans le cône de la seringue (réaspirer un peu d'air).
- Positionner de manière penchée la seringue sur son support en plastique et laisser sédimenter pendant au moins 60 minutes.

### **Isolement des leucocytes totaux**

- Après sédimentation, deux phases doivent apparaître :
  - Un culot constitué de globules rouges
  - Un surnageant contenant les leucocytes, plaquettes et GR résiduels
  - Pousser le piston afin de récupérer le surnageant de la seringue dans le tube Falcon 50 mL stérile. Arrêter de pousser le piston au niveau de l'interface entre surnageant et culot Il est souhaitable, si le volume de surnageant est suffisant (>30 mL) de ne pas prélever les derniers mL de surnageant (le fond) car ils contiennent une plus forte concentration d'érythrocytes.
  - Reproduire la même opération avec la 2eme seringue de sédimentation.
- Le surnageant récupéré constitue le Plasma Riche en Cellules (PRC).

### **Isolement des leucocytes**

- Centrifuger le PRC obtenu à 150g pendant 5 minutes. Le culot obtenu contient les leucocytes.
- Éliminer délicatement le surnageant dans un tube Falcon 60mL. Attention à ne pas éliminer le culot de leucocytes.
- Ajouter 5 mL de NaCl 0.9% avec une seringue de 5 mL au culot de leucocytes.
- Agiter doucement afin de décoller le culot.
- Après remise en suspension, centrifuger à nouveau à 150g pendant 5 minutes.
- Éliminer le surnageant dans le tube Falcon de 60 mL. Le culot obtenu contient les leucocytes «lavés».

### **Marquage au 99mTc-HMPAO :**

- Prélever 2500 MBq de pertechnétate de sodium fraîchement élué (<2h). Ajuster à 3 mL avec du NaCl 0,9%.
- Injecter dans le flacon de CERETEC® (HMPAO) et agiter 10 secondes.
- Prélever une activité comprise entre 750 et 800 MBq (soit environ 1mL) dans une seringue de 3 mL et l'ajouter au culot de leucocytes « lavés ».
- Mettre en agitation lente durant 15 min.
- Ajouter 4 ml de NaCl 0.9% avec une seringue de 5mL pour arrêter le marquage.
- Centrifuger l'ensemble 5 min à 150g.
- On obtient alors un surnageant et un culot de leucocytes marqués.
- Éliminer le surnageant (surnageant 1) à conserver pour calculer le rendement dans un tube Falcon.
- Ajouter 5 mL de NaCl 0,9% pour laver le culot.
- Centrifuger à nouveau 5 min à 150g et éliminer à nouveau le surnageant (surnageant 2) à mettre dans le tube Falcon contenant le surnageant 1.

### **Mise en forme de la préparation :**

- Mettre 4 mL de NaCl 0,9% dans le tube contenant les leucocytes marqués.
- Agiter jusqu'à homogénéisation
- Mettre en seringue la préparation qui sera prête à être injectée au patient.
- Contrôler l'aspect (absence d'agrégats)
- Contrôler l'activité (doit être supérieure à 250 MBq)
- Calculer le rendement de marquage.

$$R(\%) = F1 / (F1+F2) \times 100$$

Avec F1 : activité des leucocytes marqués (seringue + falcon); F2 : activité des surnageants.  
Il doit être supérieur à 40%.

# Isolement et marquage des leucocytes au 99mTc-HMPAO (Ceretec®)

## 1. Prélèvement



Seringues remplies à 30 ml  
(25mL de sang + 5 mL d'ACD)

↓ Ajout de 6 mL de Gélofusine 4%



Seringues remplies à 36 ml  
(25mL de sang + 5 mL d'ACD + 6 mL de Gélofusine 4%)

## 2. Sédimentation des globules rouges pendant 60 min



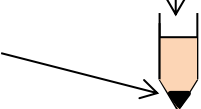
→ Elimination des culots

## 3. Isolement des leucocytes



↻ Centrifugation 150 g, 5 min

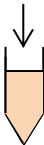
Culot de leucocytes



→ Elimination du surnageant

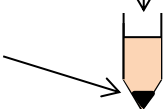
← Ajout de 5 mL de NaCl 0,9%

↻ Agitation douce



↻ Centrifugation 150 g, 5 min

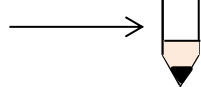
Culot de leucocytes lavés



→ Elimination du surnageant

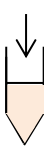
## 4. Marquage par 99mTc-HMPAO (Ceretec®) :

Ajout de 800 à 850 MBq (environ 1 mL) de Ceretec® au culot de leucocytes



→ Culot de leucocytes marqués

↻ Agitation douce 15 min



## 5. Arrêt du marquage par ajout de 4mL de NaCl 0,9%

↻ Centrifugation 150 g, 5 min

→ **Eliminer et conserver le surnageant 1 dans un tube Falcon**

← Ajout de 5 mL de NaCl 0,9%

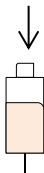
↻ Centrifugation 150 g, 5 min

→ **Eliminer et conserver le surnageant 2 dans le tube Falcon contenant le surnageant 1**

← Ajout de 5 mL de NaCl 0,9%

↻ Agitation douce jusqu'à homogénéisation

## 6. Mise en seringue



1. Absence d'agrégats

2. Activité

3. Rendement de marquage :

$$R(\%) = F1 / (F1 + F2) \times 100$$

F1 : activité des leucocytes marqués

F2 : activité des surnageants