

Fluorobeads[®]-B e Reagente Salino Tamponado com Fosfato PBS/Citrato (Fluorobeads[®]-B and Phosphate Buffered Saline PBS/Citrate Reagent)

REF Catálogo: FB2-25, FB2-100, PC1-500

IVD Uso em Diagnóstico In Vitro

USO PRETENDIDO



FluoroBeads[®]-B fornece um procedimento simples para isolamento de linfócitos B para uso em tipagem HLA de Classe II utilizando corantes fluorescentes. Para o método de isolamento de linfócitos, o reagente para uso com as FluoroBeads[®]-B é o PBS/Citrato.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

FluoroBeads[®]-B são esferas (*beads*) imunomagnéticas com menos de 1 micrômetro de diâmetro com anticorpos monoclonais anti-CD19 aderidos em sua superfície. Anticorpos CD19 se ligam especificamente a linfócitos B. FluoroBeads[®]-B oferece ao usuário um método rápido para separação de linfócitos B do sangue utilizando um coletor magnético, sem necessidade de incubações a frio, rotações ou centrifugações. O reagente PBS/Citrato melhora a performance das beads.

PRINCÍPIO(S)

As *beads* imunomagnéticas são partículas superparamagnéticas contendo anticorpos aderidos em sua superfície. As *beads* podem ser coletadas usando um campo magnético. Quando o campo magnético é removido, as *beads* não retêm qualquer magnetismo residual.

Elas podem ser repetidamente magnetizadas e redispersas. A especificidade do anticorpo monoclonal acoplado determina o tipo de célula coletada.

REAGENTES

A. Identificação

FluoroBeads[®]-B são partículas superparamagnéticas ligadas a anticorpo monoclonal anti-CD19, suspensas em BSA/PBS e tendo a azida sódica como conservante. O anticorpo monoclonal é de origem murina. O reagente PBS/Citrato contém ácido cítrico, citrato de sódio, PBS e outros ingredientes proprietários.



B. Avisos ou Precauções

1. **AVISO:** Todos os produtos derivados do sangue devem ser tratados como potencialmente infecciosos. O material de origem do qual este produto foi derivado foi considerado negativo quando testado de acordo com os testes atuais exigidos pelo FDA. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer garantia de que produtos derivados de sangue humano não transmitirão agentes infecciosos.
2. **AVISO:** Este reagente contém 0,01% de azida sódica que, sob condições ácidas, produz ácido hidrazônico, um composto extremamente tóxico. Reagentes contendo azida sódica devem ser diluídos em água corrente antes de serem descartados. Estas condições são recomendadas para evitar depósitos no encanamento onde condições explosivas podem se desenvolver.
3. **CUIDADO:** Não utilizar heparina de lítio como anticoagulante na amostra de sangue.
4. Consultar a FISPQ para informações mais detalhadas.



C. Instruções de Uso

Ver seção INSTRUÇÕES DE USO.

D. Instruções de Armazenamento

Armazenar os reagentes à temperatura indicada na embalagem. Usar antes da data de validade impressa.

E. Purificação ou Tratamento Necessário para Uso

Antes de usar, ressuspender as FluoroBeads®-B agitando no vortex por aproximadamente 10 segundos.

F. Indicações de Instabilidade

Não utilizar se as beads apresentarem grumos. Agrupamento intenso de beads podem indicar deterioração do produto.

COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

Coletar 10 ml aproximadamente de sangue total. Preferencialmente utilizar anticoagulante ACD ou CPDA. **Não utilizar heparina de lítio!** As células B devem ser isoladas dentro de 24 horas para atingir maior rendimento. No entanto, sangue com até 3 dias pós-coleta pode ser utilizado. Armazenar a amostra de sangue horizontalmente em temperatura ambiente (20 a 25°C) até o início do procedimento de isolamento.

PROCEDIMENTO

A. Materiais Fornecidos

1. FluoroBeads®-B
2. Instruções para isolamento e teste de células

Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Placas Terasaki para tipagem Classe II (One Lambda ou equivalente)
2. Tubos de centrifugação de plástico ou vidro, com tampa, volumes 5 ml e 1.5 ml
3. Solução salina com fosfato (PBS) **sem sais Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺** (Irvine Scientific Cat. #9249)
4. Meio McCoy ou equivalente **com 5% HIFCS**
5. Separador Magnético (One Lambda ou equivalente)
6. Aspirador ou pipetas descartáveis
7. Reagente PBS/Citrato
 - a. OLI Cat. PC1-500
 - b. Reagente PBS/Citrato
 - 1) Solução Estoque (10X Citrato): Dissolver 7 mg Citrato Trissódico Dihidratado e 2.5 mg de Ácido Cítrico em 90 ml de água destilada. Acertar o volume final para 100 ml. Filtrar, esterilizar e armazenar entre 2°C a 5° C.
 - 2) Solução de trabalho (1X PBS/Citrato): Adicionar 10 ml de Citrato 10X em 90 ml de PBS. Filtrar, esterilizar e armazenar entre 2° a 5° C.
8. Soro Bovino Fetal inativado pelo calor (HIFCS)
 - a. Solução estoque: aquecer FCS a 56 ° C por 30 minutos para inativar o complemento. Armazenar entre 2°C a 5°C ou fracionar e congelar a -20°C.
 - b. Solução de trabalho: adicionar 5 ml de solução estoque de HIFCS em 95 ml de meio de McCoy ou equivalente.

B. Materiais Opcionais, não fornecidos

1. Ficoll-Hypaque
2. Percoll
 - a. Solução estoque (Percoll-X): combinar 1 parte de PBS 10X e 9 partes de Percoll. [(D) = 1.077].
 - b. Solução de trabalho (50% Percoll): combinar partes iguais de Percoll-X e PBS.
3. Reagentes de Coloração/Fixação:
 - a. *Acridine Orange/Ethidium Bromide FluoroQuench™* (OLI Cat FQAE500), ou
 - b. *Ethidium Bromide FluoroQuench™* (OLI Cat. FQEB500), ou
 - c. Adicionar 1 ml de solução estoque de EB em 9 ml de hemoglobina ou tinta 1% (verificar Materiais número 4 a 9)

Atenção: A azida sódica é tóxica. Sempre utilizar equipamentos de proteção durante o manuseio.

4. Hemoglobina: Dissolver 10 mg de hemoglobina liofilizada em 90 ml de EDTA/PBS 5%. Acertar o

- volume para 99 ml. Adicionar 1 ml de azida sódica 1%. Centrifugar a 1000 g por 45 minutos. Armazenar o sobrenadante a -20° C.
5. Tinta: Dissolver 1 mg de albumina sérica bovina (BSA) em 10 ml de EDTA/PBS 5%. Adicionar 0.1 ml de azida sódica 1% e 0.1 ml de tinta caligráfica *Higgins Black (Higgins Black Calligraphy Ink)*.
 6. Azida sódica 1%: Dissolver 1 mg de azida sódica em 100 ml de PBS.
 7. Ácido etilenodiamino tetra-acético 5% (EDTA)/PBS: Adicionar 5 mg EDTA em 90 ml de PBS. Ajustar o pH para 7.2 com NaOH 10 M para dissolver o EDTA. Ajustar o volume para 100 ml com PBS.
 8. Brometo de Etídio (EB) solução estoque: Dissolver 50 mg em 1 ml de água destilada; adicionar 49 ml de PBS. Aquecer em banho-maria a 56° C por 30 minutos. Aliquotar e congelar a -20° C.
 9. Diacetato Carboxifluoresceína (CFDA)
 - a. Solução estoque CFDA: Em um tubo de vidro, dissolver 10 mg de CFDA em 1 ml de acetona. Armazenar a -20° C, protegido da luz.
 - b. Solução de trabalho. Utilizar uma das opções:
 1. Preparada em PBS pH 7.2: Adicionar 30 µl da solução CFDA estoque em 5 ml de PBS (pH 7.2). Armazenar entre 2°C a 5°C por até uma semana.
 2. Preparada em PBS pH 5.5: Adicionar 30 µl da solução CFDA estoque em 5 ml de PBS (pH 5.5). Armazenar entre 2 a 5° C por até uma semana.

Procedimento passo a passo

2. Ver INSTRUÇÕES DE USO abaixo

Instruções de Uso

Técnicas de Isolamento

A. Isolamento a partir de *Buffy Coat*

1. Centrifugar o sangue total entre 400 a 900 g por 10 minutos.
2. Transferir aproximadamente 1 ml de *buffy coat* para um tubo de 5 ml.
3. Adicionar 4 ml de PBS/Citrato.
4. Ressuspender as FluoroBeads®-B completamente antes de usar. Agitar no vortex por aproximadamente 10 segundos.
5. Adicionar 100 µl de FluoroBeads®-B à amostra de sangue. Imediatamente tampar o tubo e inverter 2 a 3 vezes para dispersar as beads magnéticas.
6. Rotacionar o tubo uma vez por segundo durante **3 minutos** a 20°C – 25°C para permitir que as beads se liguem às células B. Não exceder 4 minutos. Utilizar um dispositivo rotativo ou misturar manualmente.
7. Retirar a tampa e colocar o tubo em um separador magnético por 2 minutos. Não exceder 3 minutos.
8. Remover o sobrenadante com uma pipeta e descartar. Remover o tubo da estante magnética.
9. Ressuspender as células (beads) com 1 a 2 ml de PBS/citrato. Agitar gentilmente o tubo para dispersar as beads. Recolocar o tubo no separador magnético por 1 minuto. Remover o sobrenadante e descartar. Repetir duas vezes, utilizando somente PBS.
10. Proceder com “Marcação e Concentração de Células” (abaixo), ou ressuspender as células (beads) em 0,5ml de meio McCoy (ou equivalente) com 5% de HIFCS.

B. Isolamento a partir de interface de Ficoll

1. Centrifugar o sangue com citrato ou heparina durante 10 minutos a 400 - 900 g.
2. Coletar o *buffy coat* e diluir com um volume igual de PBS. Misturar bem.
3. Acomodar no máximo 2 ml de mistura de buffy coat/PBS sobre 1,5 ml de Ficoll-Hypaque (Densidade (D) = 1,077) em tubos de 5 ml e centrifugar por 10 minutos a 1000 g.
4. Coletar aproximadamente 1 ml de interface de cada tubo e transferir para um tubo de centrifugação. Centrifugar durante 1,5 minutos a 3000 g ou 10 minutos a 1000 g.
5. Descartar o sobrenadante, ressuspender o pellet em PBS. Centrifugar por 5 minutos a 1000 g (remove a maioria das plaquetas).
6. Descartar o sobrenadante com uma pipeta descartável. Ressuspender o pellet em 1 ml de HIFCS/PBS 20%.
7. Dispensar 100 µl de FluoroBeads®-B à amostra e tampar o tubo.
8. Rotacionar a amostra uma vez por segundo durante 3 minutos a 20° - 25° C.
9. Abrir o tubo e deixar no separador magnético por 1 minuto.

Fluorobeads®-T.

11. Ressuspender as beads/células em 1 ml de HIFCS/PBS 20%. Agitar gentilmente o tubo para ressuspender as beads. Colocar no separador magnético por 30 segundos. Descartar o sobrenadante com uma pipeta descartável. Repetir duas vezes.
12. Proceder com “Marcação e Concentração de Células” (abaixo), ou ressuspender as células (beads) em 0,5ml de meio McCoy (ou equivalente) com 5% de HIFCS.

C. Isolamento a partir de interface de Ficoll congelada

1. Descongelar células totais a 56°C (remoção de DMSO não é necessária).
2. Acomodar 0,5 ml de suspensão de células sobre 0,5 ml de Percoll 50% em um tubo de centrifugação de 1,5 ml.
3. Centrifugar em 2000 g por 2 minutos ou 400 g por 10 minutos
4. Descartar o sobrenadante com uma pipeta descartável.
5. Ressuspender as células em 1 ml de HIFCS/PBS 20%.
6. Dispensar 100 µl de Fluorobeads®-B às amostras e tampar o tubo.
7. Rotacionar o tubo uma vez por segundo durante 3 minutos a 20°C - 25° C.
8. Abrir o tubo e deixar no separador magnético por 1 minuto.
9. Transferir o sobrenadante para um outro tubo de centrifugação para o isolamento de linfócitos T com Fluorobeads®-T.
10. Ressuspender as beads/células em 1 ml de HIFCS/PBS 20%. Agitar gentilmente o tubo para ressuspender as beads. Colocar no separador magnético por 30 segundos. Descartar o sobrenadante com uma pipeta descartável. Repetir duas vezes.
11. Proceder com “Marcação e Concentração de Células” (abaixo), ou ressuspender as células (beads) em 0,5ml de meio McCoy (ou equivalente) com 5% de HIFCS.

D. Isolamento a partir de Sangue Total

1. Transferir 5 ml de sangue total para um tubo de 15 ml.
2. Adicionar 5 ml de PBS/Citrato 1X e agitar por inversão.
3. Dispensar 100 µl de Fluorobeads®-B às amostras e rotacionar 1 vez por segundo durante 5 minutos (não ultrapassar esse tempo). Utilizar um dispositivo rotativo ou misturar manualmente a 20°C - 25° C.
4. Abrir o tubo e colocar no separador magnético por 5 minutos. Remover o sobrenadante e descartar. Retirar o tubo da estante magnética.
5. Adicionar 2 a 3 ml de PBS/Citrato 1X à amostra. Agitar gentilmente para ressuspender as beads. Colocar o tubo na estante magnética por 1 minuto. Repetir duas vezes usando somente PBS.
6. Proceder com “Marcação e Concentração de Células” (abaixo), ou ressuspender as células (beads) em 0,5ml de meio McCoy (ou equivalente) com 5% de HIFCS.

Marcação e concentração de células

A. Método CFDA

1. Abrir o tubo e colocar no separador magnético durante 1 minuto. Remover o sobrenadante. Ressuspender as células (beads) com PBS. Repetir duas vezes.
2. Adicionar 0,5 ml de CFDA (solução de trabalho pH 5,5) e misturar.
3. Incubar o tubo horizontalmente no escuro durante 10 minutos a 20 – 25°C.
4. Repetir o passo 1.
5. Ressuspender as células em 0,5 ml de meio McCoy com HIFCS 5% (ou equivalente).
6. Adicionar 1 µl de suspensão celular em um poço vazio de uma placa Terasaki. Verificar a contagem de células com um microscópio fluorescente. Ajustar a concentração para 2×10^6 células / ml (2.000 células por poço).
7. As amostras podem ser transferidas para tubos de 1,5 ml e armazenadas na horizontal a 2 – 5°C até 2 dias antes do teste.

B. Método FQAE

1. Adicionar 1 µl de células (beads) a um poço de uma placa Terasaki.
2. Adicionar 5 µl de FQAE (OLI Cat. FQAE-500) ao poço.
3. Verificar a contagem de células com um microscópio fluorescente. Ajustar a concentração de células para 2×10^6 células / ml (2.000 células por poço).
4. As amostras podem ser transferidas para tubos de 1,5 ml e armazenadas na horizontal a 2 – 5°C até 2 dias antes do teste.

Procedimentos para tipagem DR

Nota: Os itens a seguir são protocolos recomendados. Os tempos de incubação podem variar dependendo da força dos reagentes de tipagem e/ou complemento utilizados. Para reagentes de tipagem One Lambda o tempo sugerido é 30 minutos com anticorpo e 60 minutos com complemento.

A. Método CFDA

1. Misturar a preparação das células batendo no pellet e invertendo o tubo. Não misturar com seringa. Adicionar 1 µl de células CFDA em cada poço de uma placa de tipagem de Classe II
2. Incubar no escuro por 30 minutos a 20°C - 25°C (**Para placas monoclonais DR, incubar por 60 minutos a 20° - 25° C e prosseguir para o passo 5**)
3. Adicionar 5 µl de Complemento de Coelho em cada poço.
4. Incubar a placa no escuro por 1 hora a 20°C - 25°C.
5. Em cada poço, adicionar 5 µl de **um** dos itens a seguir:
 - a. *FluoroQuench™ Ehtidium Bromide* (OLI Cat. FQEB500), **ou**
 - b. Solução de trabalho EB/hemoglobina, **ou**
 - c. Solução de trabalho EB/tinta 1%.
6. As placas podem ser lidas imediatamente ou podem ser armazenadas por até 2 dias, mantidas no escuro, a 20°C – 25°C.

B. Método FQAE

1. Misturar a preparação das células batendo no pellet e invertendo o tubo. Não misturar com seringa. Adicionar 1 µ de células (beads) em cada poço de uma placa de tipagem Classe II.
2. Incubar por 30 minutos a 20°C - 25°C. (Para placas monoclonais DR, incubar por 60 minutos a 20° - 25° C e prosseguir para o passo 5).
3. Adicionar 5 µl de Complemento DR em cada poço.
4. Incubar por 1 hora no escuro a 20°C - 25°C.
5. Em cada poço, adicionar 5 µl de FQAE.
6. As placas podem ser lidas imediatamente ou podem ser armazenadas por até 2 dias, mantidas no escuro, a 20°C – 25°C.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O rendimento celular varia de acordo com cada amostra, dependendo da contagem de células e do tempo desde a coleta de sangue. Várias doenças podem causar uma diminuição no rendimento dos linfócitos. Alguns medicamentos também podem causar essa diminuição de rendimento, e podem causar uma diminuição na expressão do antígeno HLA. As amostras cadavéricas podem ter baixos rendimentos de linfócitos com contaminação elevada de monócitos e granulócitos.

A contaminação com outras células pode causar reações negativas fracas/falsas. Os monócitos têm uma quantidade variável de antígenos HLA de Classe I e Classe II. As plaquetas possuem antígenos HLA Classe I e podem enfraquecer os antissoros, absorvendo os anticorpos dos mesmos.

VALORES ESPERADOS

FluoroBeads®-B contém beads imunomagnéticas suficientes para isolar mais de 90% das células B CD19⁺ em um *buffy coat* proveniente de 10 ml de sangue total.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

A pureza dos linfócitos isolados deve ser superior a 90%. As células devem ser reativas com soros anti-HLA, e devem ser lisadas sob condições padrão de ensaio de linfocitotoxicidade.

BIBLIOGRAFIA

Não aplicável.

MARCAS E ISENÇÕES DE RESPONSABILIDADE

® FluoroBeads é marca registrada de One Lambda, Inc.

REPRESENTANTE AUTORIZADO NA UNIÃO EUROPÉIA

EC REP MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175, Hannover, Germany

REPRESENTANTE BRASILEIRO AUTORIZADO

BIOMETRIX DIAGNÓSTICA LTDA.

Estrada da Graciosa, 1081 - Curitiba – PR - CEP: 82840-360

Tel.: (41) 2108-5250 Fax: (41) 2108-5252 DDG: 0800-7260504
E-mail: suporte@biometrix.com.br Website: www.biometrix.com.br
CNPJ: 06.145.976/0001-39

INFORMAÇÕES DO FABRICANTE

One Lambda, Inc.
22801 Roscoe Blvd
West Hills – CA – EUA

REGISTRO ANVISA
80298490001

RESPONSÁVEL TÉCNICA
Giuliana Reis Clementi Pacheco
CRBio: 83.440/07-D

HISTÓRICO DE REVISÃO

| Revisão | Data | Descrição da Revisão |
|---------|------------|---|
| 11 | 11/2013 | Removida designação (Para Uso Geral em Laboratório); Substituído símbolo (IVD) e designação (Para Uso em Diagnóstico In Vitro). Adicionado cabeçalho na segunda página. Adicionada seção Trademark Disclaimer. Modified heading to match those underlined. Modified bulleted lists to double columns. |
| 01 | 08/04/2019 | Melhoria no sistema de Controle de Documentos Internos. Nenhuma alteração no conteúdo do documento. |
| 02 | atual | Atualizado as informações de contato e endereço para refletir a mudança no local fabricação legal. Inclusão do representante brasileiro autorizado. |

