

FLUOROBeads®-T AND FLUOROBeads®-T DEVELOPER

REF AGENTE DE DESENVOLVIMENTO FLUOROBeads®-T E FLUOROBeads®-T

Nºs de Catálogo FB1-25, FB1-100 e FB1-DEV

IVD Para utilização em diagnóstico in vitro.

UTILIZAÇÃO PREVISTA

O FluoroBeads®-T oferece um procedimento simples para o isolamento de linfócitos T para utilização em ensaios de microcitotoxicidade utilizando corantes fluorescentes. O Agente de Desenvolvimento FluoroBeads®-T foi criado especificamente para ser utilizado no método de isolamento do FluoroBeads®-T.

RESUMO E EXPLICAÇÃO

O FluoroBeads®-T contém esferas imunomagnéticas com menos de 1 micrão de diâmetro. Os anticorpos monoclonais anti-CD2 estão acoplados à superfície das esferas, ligando-se especificamente ao receptor E-rosette nos linfócitos T. O produto FluoroBeads®-T oferece ao utilizador um método rápido para a separação dos complexos de linfócitos T/FluoroBeads®-T do sangue, utilizando um ímã coletor. O método FluoroBeads®-T não necessita de quaisquer processos de centrifugação, rotação ou incubação a frio. O reagente FluoroBeads®-T foi especificamente concebido para melhorar o desempenho das esferas imunomagnéticas FluoroBeads®-T.

PRINCÍPIO

As esferas imunomagnéticas constituem partículas superparamagnéticas com anticorpos monoclonais acoplados na respectiva superfície. As esferas podem ser recolhidas utilizando um campo magnético. Depois de retirado o campo magnético, as esferas não retêm qualquer tipo de magnetismo residual. As esferas podem ser repetidamente magnetizadas e novamente dispersadas. A especificidade do anticorpo monoclonal acoplado determina o tipo de célula recolhida.

REAGENTES

A. Identificação

O produto FluoroBeads® é composto por partículas superparamagnéticas acopladas a anticorpos monoclonais e suspensas em PBS com estabilizadores e azida sódica como conservante. Os anticorpos monoclonais têm origem murina. O agente de desenvolvimento FluoroBeads contém ingredientes exclusivos não tóxicos.



B. Advertência ou Precaução

- ADVERTÊNCIA:** Todos os produtos derivados do sangue deverão ser tratados como potencialmente infecciosos. Constatou-se que o material de origem do qual deriva este produto é negativo quando testado em conformidade com os testes atualmente exigidos pela FDA. Nenhum método de teste conhecido pode oferecer garantias de que os produtos derivados do sangue humano não transmitem agentes infecciosos.
- ADVERTÊNCIA:** Este reagente contém azida sódica a 0,01% que, mediante condições ácidas, produz ácido hidrazóico, um composto extremamente tóxico. Os reagentes que contêm azida sódica devem ser diluídos em água corrente antes de serem eliminados. São recomendadas estas condições para evitar depósitos nas canalizações onde se podem desenvolver condições de explosão.
- AVISO:** Não utilizar a heparina de lítio ou EDTA como anticoagulante para a sua amostra de sangue.

- Consultar a Folha de Dados de Segurança do Material para informações pormenorizadas.

C. Instruções de Utilização

Consultar as INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO na página 3.



D. Instruções de Armazenamento

Armazene os reagentes à temperatura indicada na embalagem. Utilize antes do final do prazo de validade impresso.

E. Purificação ou Tratamento Necessário para Utilização

FluoroBeads®-T: É necessário re-suspender antes de utilizar, submetendo a uma agitação vórtex durante 10 segundos.

Agente de desenvolvimento: Dilua uma parte (10X) de solução stock com nove partes de 1X PBS sem sais Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺. Armazenar a 2 – 5°C.

F. Indicações de Instabilidade

FluoroBeads®-T: Não utilize se as esferas apresentarem sinais de aglutinação. Uma aglutinação acentuada das esferas poderá indicar uma deterioração do produto.

Agente de desenvolvimento: O agente de desenvolvimento 10X deverá consistir numa solução clara ligeiramente colorida. A formação de precipitados poderá indicar instabilidade ou contaminação bacteriana.

COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Retirar aproximadamente 10 ml do sangue total. O anticoagulante preferencial é ACD ou CPDA. *Não utilize heparina de lítio!* As células T deverão ser isoladas no espaço de 24 horas para obter o máximo rendimento. No entanto, é possível utilizar sangue com, no máximo, 3 dias. Armazene as amostras de sangue na horizontal e à temperatura ambiente (20–25°C).

PROCEDIMENTO

A. Materiais Fornecidos

1. FluoroBeads®-T
2. Instruções de análise e isolamento das células
3. Agente de desenvolvimento FluoroBeads®-T (10X). Consultar “Purificação ou Tratamento Necessário para Utilização” para mais instruções relativas a 1X.

B. Materiais Necessários mas Não Fornecidos

1. Placas de tipagem tecidular de classe I (One Lambda ou equivalentes)
2. Tubos de vidro ou plástico para centrifuga, de 5 ml e 1,5 ml, com tampas
3. Solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem Ca^{++} e Mg^{++} (ou seja, Irvine Scientific N° de Catálogo 9242)
4. Meio de McCoy ou equivalente com HIFCS a 5%
5. Separador magnético (One Lambda ou equivalente)
6. Aspirador ou pipetas descartáveis
7. Soro fetal de bezerro inativado pelo calor (HIFCS)
 - a) Solução stock: aqueça o FCS a 56°C durante 30 minutos para inativar o complemento. Armazene a uma temperatura entre 2 e 5°C ou alíquote e congele a -20°C.
 - b) Solução de trabalho: adicione 5 ml de solução stock de HIFCS a 95 ml de meio de McCoy ou equivalente.

C. Materiais Opcionais Não Fornecidos

1. Ficoll-Hypaque
2. Percoll
 - a) Solução stock (Percoll-X): combine 1 parte de 10X PBS com 9 partes de Percoll.
 - b) Solução de trabalho (Percoll a 50%): combine partes iguais de Percoll-X e PBS.
3. Reagentes de coloração/extinção:
 - a) Laranja de acridina/Brometo de etídio FluoroQuench™ (Número de catálogo OLI FQAE500), ou
 - b) Brometo de etídio FluoroQuench™ (Número de catálogo OLI FQEB500), ou

- c) Adicione 1 ml de solução stock de EB a 9 ml de hemoglobina ou 1% tinta (consulte Materiais N°s 11 – 14).

4. Hemoglobina: Dissolva 10 mg de hemoglobina liofilizada em 90 ml de EDTA/PBS a 5%. Perfaça um volume final de 99 ml. Adicione 1 ml de azida sódica a 1%. Centrifugue a 1000 g durante 45 minutos. Armazene o sobrenadante a -20°C.
5. Tinta: Dissolva 1 gm de albumina sérica bovina (BSA) em 10 ml de EDTA/PBS a 5%, adicione 0,1 ml de azida sódica a 1% e 0,1 ml de Tinta de Caligrafia Preta Higgins.
6. Azida sódica a 1%: Dissolva 1 mg de azida sódica em 100 ml de PBS.
Precaução: A azida sódica é tóxica. Usar sempre equipamento de proteção ao manusear.
7. Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)/PBS a 5%: Adicione 5 mg de EDTA a 90 ml de PBS. Ajuste o pH para 7,2 com 10 M de NaOH para dissolver o EDTA. Perfaça um volume de 100 ml com PBS.
8. Brometo de etídio (solução stock): dissolva 50 mg em 1 ml de água destilada. Adicione 49 ml de PBS. Aqueça em banho-maria a 56°C durante 30 minutos. Alíquote e congele a -20°C.
9. Diacetato de carboxifluoresceína (CFDA)
 - a) Solução CFDA stock: Num tubo de vidro, dissolva 10 mg de CFDA em 1 ml de acetona. Armazene a -20°C, no escuro.
 - b) Solução de trabalho: Use uma das seguintes:
 - Preparada em PBS a pH 7,2: Adicione 30 µl de solução CFDA stock a 5 ml de PBS (pH 7,2). Armazene a 2 – 5°C durante um período máximo de 1 semana.
 - Preparada em PBS a pH 5,5: Adicione 30 µl de solução CFDA stock a 5 ml de PBS (pH 5,5). Armazene a 2 – 5°C durante um período máximo de 1 semana.

D. Procedimento passo-a-passo.

Consultar as INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO na página 3.

INSTRUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

TÉCNICAS DE ISOLAMENTO

A. Isolamento a partir de Sangue Total

1. Dispense 2 ml de sangue num tubo de 5 ml.
2. É necessário ressuspender completamente o produto FluoroBeads®-T antes de utilizar. **Submeta ao agitador vórtex durante cerca de 10 segundos**
3. Adicione 100 µl de FluoroBeads®-T à amostra de sangue. Vede imediatamente o tubo e inverte-o 2 a 3 vezes para dispersar as esferas magnéticas.

4. Rode o tubo uma volta por segundo, durante 3 minutos, a uma temperatura entre 20 e 25°C para permitir que as esferas se unam às células T. **Não ultrapasse os 4 minutos**. Use um dispositivo de rotação de tambor vertical ou misture manualmente.
5. Adicione 2 ml de agente de desenvolvimento 1X (consultar as instruções “Tratamento Necessário para Utilização” acima). Vede o tubo e inverte-o 2 a 3 vezes para misturar. **Esta etapa é essencial!**

- Abra e coloque o tubo num separador magnético durante 3 minutos completos.
- Remova e elimine o sobrenadante com uma pipeta descartável. Retire o tubo do campo magnético.
- Ressuspenda as células (esferas) com 1 a 2 ml de PBS. Agite suavemente o tubo para dispersar as esferas. Volte a colocar o tubo no separador magnético durante 1 minuto. Remova e elimine o sobrenadante. Repita mais duas vezes.
- Prossiga para “Procedimentos de Rotulagem e Concentração das Células” (em baixo), ou ressuspenda as células (esferas) em 0,5 ml de meio de McCoy ou equivalente com HIFCS a 5%.

B. Isolamento a partir da Interface Ficoll

- Centrifugue o sangue citratado ou heparinizado durante 10 minutos a 400 – 900 g.
- Proceda à coleta da camada leucocitária e dilua com um volume igual de PBS. Misture bem.
- Disponha uma camada com, no máximo, 2 ml da mistura camada leucocitária/PBS sobre 1,5 ml de Ficoll-Hypaque [Densidade (D) = 1,077] em tubos de 5 ml e centrifugue durante 10 minutos a 1000 g.
- Proceda à coleta de, aproximadamente, 1 ml de interface de cada tubo e transfira para tubos para centrifuga. Centrifugue durante 1,5 minuto a 3000 g ou 10 minutos a 1000 g.
- Elimine o sobrenadante e ressuspenda o concentrado em PBS. Centrifugue durante 5 minutos a 1000 g (remove a maioria das plaquetas).
- Elimine o sobrenadante com uma pipeta descartável. Ressuspenda o concentrado em 1 ml de HIFCS/PBS a 20%.
- Dispense 100 µl de FluoroBeads®-T num tubo de ensaio e vede.
- Rode a amostra durante 3 minutos a uma temperatura entre 20 e 25°C.
- Abra e coloque o tubo num separador magnético durante 1 minuto.
- Retire e guarde o sobrenadante em outro tubo para o isolamento dos linfócitos B com FluoroBeads®-B.
- Ressuspenda as esferas/células em 1 ml de HIFCS/PBS a 20%. Agite suavemente o tubo para ressuspender as esferas. Coloque no separador magnético durante 30 segundos. Elimine o sobrenadante com uma pipeta descartável. Repita mais duas vezes.
- Prossiga para “Procedimentos de Rotulagem e Concentração das Células” (em baixo), ou ressuspenda as células (esferas) em 0,5 ml de meio de McCoy ou equivalente com HIFCS a 5%.

C. Isolamento a partir da Interface Ficoll Congelada

- Descongele as células totais a 37°C (não é necessária uma remoção do DMSO).
- Disponha uma camada de 0,5 ml de suspensão de células sobre 0,5 ml de Percoll a 50% num tubo para centrifuga de 1,5 ml.
- Centrifugue a 2000 g durante 2 minutos ou a 400 g durante 10 minutos.

- Elimine o sobrenadante com uma pipeta descartável.
- Ressuspenda as células em 1 ml de HIFCS/PBS a 20%.
- Dispense 100 µl de FluoroBeads®-T para o tubo de ensaio e vede.
- Rode a amostra durante 3 minutos a uma temperatura entre 20 e 25°C.
- Abra e coloque o tubo num separador magnético durante 1 minuto.
- Transfira o sobrenadante para outro tubo para centrifuga para o isolamento dos linfócitos B com FluoroBeads®-B.
- Ressuspenda as esferas/células restantes em 1 ml de HIFCS/PBS a 20%. Agite suavemente para ressuspender as esferas e coloque o tubo num separador magnético durante 30 segundos. Elimine o sobrenadante utilizando uma pipeta descartável. Repita este procedimento duas vezes.
- Prossiga para “Procedimentos de Rotulagem e Concentração das Células” (abaixo), ou ressuspenda as células (esferas) em 0,5 ml de meio de McCoy ou equivalente com HIFCS a 5%.

PROCEDIMENTOS DE ROTULAGEM E CONCENTRAÇÃO DAS CÉLULAS

A. Método CFDA

- Abra e coloque o tubo num separador magnético durante 1 minuto. Remova o sobrenadante. Lave as células (esferas) duas vezes com PBS.
- Adicione 0,5 ml de CFDA (solução de trabalho, pH 5,5) e misture.
- Incube o tubo horizontalmente, no escuro, durante 10 minutos a uma temperatura entre 20 e 25°C.
- Separe magneticamente (conforme acima descrito) e lave as células duas vezes com PBS.
- Ressuspenda as células em 0,5 ml de meio de McCoy ou equivalente com HIFCS a 5%.
- Adicione 1 µl de suspensão das células a um poço vazio de uma placa Terasaki. Verifique a contagem de células com um microscópio de fluorescência. Ajuste a concentração para 2×10^6 células/ml (2.000 células por poço).
- É possível transferir as amostras para tubos de 1,5 ml e armazenar na horizontal a $2 - 5^\circ\text{C}$ durante, no máximo, 2 dias antes da realização do teste.

B. Método FQAE

- Adicione 1 µl de células (esferas) a um poço de uma placa Terasaki.
- Adicione 5 µl de FQAE (Número de catálogo OLI FQAE-500) ao poço.
- Verifique a contagem de células com um microscópio de fluorescência. Ajuste a concentração das células para 2×10^6 células/ml (2000 células por poço).
- É possível transferir as amostras para tubos de 1,5 ml e armazenar na horizontal a $2 - 5^\circ\text{C}$ durante, no máximo, 2 dias antes da realização do teste.

TIPAGEM ABC

A. Método CFDA

1. Misture a preparação celular, batendo ligeiramente no concentrado e invertendo o tubo. Não utilize uma seringa para misturar. Adicione 1 µl de células (esferas) rotuladas com CFDA em cada poço de uma placa de tipagem HLA Classe I.
2. Incube, no escuro, durante 30 minutos a 20 – 25°C. **(Para OLI LMT™, incube durante 60 minutos a 20 – 25°C e prossiga para a etapa nº 5.)**
3. Adicione 5 µl de complemento de coelho ABC a cada poço.
4. Incube a placa, no escuro, durante 1 hora a uma temperatura entre 20 e 25°C.
5. Em cada poço, adicione 5 µl de **um** dos seguintes reagentes de extinção:
 - a) Brometo de etídio FluoroQuench™ (Número de catálogo OLI FQEB500), ou
 - b) Solução de trabalho de EB/hemoglobina, ou
 - c) Solução de trabalho de EB/tinta a 1%.

6. As placas podem ser lidas imediatamente ou armazenadas no escuro a 2 – 5°C durante um período máximo de 2 dias.

B. Método FQAE

1. Misture a preparação celular, batendo ligeiramente no concentrado e invertendo o tubo. Não utilize uma seringa para misturar. Adicione 1 µl de células (esferas) a cada poço de uma placa de tipagem HLA Classe I.
2. Incube durante 30 minutos a 20 – 25°C. (Para OLI LMT™, incube durante 60 minutos a 20 – 25°C e prossiga para a etapa nº 5.)
3. Adicione 5 µl de complemento ABC a cada poço.
4. Incube durante 1 hora, no escuro, a uma temperatura entre 20 e 25°C.
5. A cada poço, adicione 5 µl de FQAE.
6. As placas podem ser lidas imediatamente ou armazenadas no escuro a 2 – 5°C durante um período máximo de 2 dias.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

O rendimento das células irá variar com cada amostra, dependendo da contagem celular e o tempo decorrido desde a coleta de sangue. São várias as doenças que podem provocar uma redução no rendimento dos linfócitos. Além disso, existem alguns medicamentos que também podem provocar uma redução no rendimento dos linfócitos e na expressão de antígenos HLA. As amostras de doadores cadáver apresentam rendimentos baixos de linfócitos com uma contaminação elevada de monócitos e granulócitos.

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

VALORES ESPERADOS

O produto FluoroBeads®-T contém esferas imunomagnéticas suficientes para isolar mais de 90% das células T CD2+ em 1 ml de sangue total.

Características de Desempenho Específicas

A pureza dos linfócitos isolados deverá ser superior a 90%. As células deverão reagir com soros anti-HLA e deverão ser lisadas de acordo com as condições normalizadas para ensaio de linfocitotoxicidade.

EC REP REPRESENTANTE EUROPEU AUTORIZADO

MDSS GmbH, Schiffgraben 41, 30175, Hannover, Alemanha

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

80298490007

MARCAS COMERCIAIS E RENÚNCIA DE RESPONSABILIDADE

® FluoroBeads é uma marca registrada da One Lambda, Inc.

HISTÓRICO DE REVISÕES

Revisão	Data	Descrição da Revisão
8	2013/11	Removida a designação (Para utilização geral em laboratório); Substituída com o símbolo (IVD) e a designação (Para utilização em diagnóstico in vitro). Acrescentado cabeçalho da segunda página. Acrescentada a seção "Marcas comerciais e renúncia de responsabilidade". Harmonizada a formatação de todos os títulos. Transformadas as listas em colunas duplas.
01	04/08/2019	Sistema de Controle de Documentos Internos Atualizado. Sem alterações ao conteúdo do documento.
02	Em vigor	Informações de local e contato atualizados para refletir a alteração no local legal de fabricação. Inclusão das informações do representante brasileiro autorizado.

