

IgG de Cabra Anti-humana Kappa (Cadeias leves livres e ligadas) (Goat IGG Anti-Human Kappa (Free and Bound Light Chains))

Catálogo AHG1, AHG50

Para uso exclusivo em pesquisa. Não usar em procedimentos diagnósticos

REAGENTES

A. Identificação

AHG é uma cadeia leve kappa anti-humano de cabra, produzida por imunização com proteína Bence-Jones purificada. As frações de IgG são preparadas a partir dos anti-soros monoespecíficos combinados por precipitação com sal e cromatografia de troca iônica.

Nenhuma citotoxicidade detectável foi encontrada quando testada diretamente contra linfócitos humanos de vários alotipos (painel PRA). A atividade anti-complementar também foi considerada negativa. Diluições de trabalho para este produto devem ser validadas em cada laboratório, empregando reagentes e métodos estabelecidos pelo laboratório.

Este soro é monoespecífico contra cadeias leves kappa humanas, tanto livres como ligadas, e não é reativo para cadeias leves lambda como avaliado por imunoeletroforese.



B. Advertência ou Precaução

1. Somente para uso em pesquisa. Não utilizar em procedimentos diagnósticos.
2. Aviso: Este reagente contém 0,1% de azida sódica como conservante. Sob condições ácidas, a azida sódica 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: O AHG NUNCA deve ser armazenado em um estado diluído.
4. Consultar a FISPQ para obter informações detalhadas.



C. Instruções para Armazenamento

Armazenar os reagentes à temperatura indicada na embalagem. Utilizar antes da data de validade impressa. AHG NUNCA deve ser armazenado em um estado diluído. É estável por longos períodos se armazenado abaixo de -65°. Consultar "Instruções para uso".

EQUIPAMENTOS NECESSÁRIOS

- Seringa Hamilton ou equivalente
- Centrifuga com acessórios apropriados para acomodar as placas Terasaki

COLETA E PREPARO DE AMOSTRAS

- A. Um (1) ml de soro é necessário para o teste. Obter o soro retirando uma amostra de 5 ml de sangue em um tubo Vacutainer® vermelho (sem anticoagulante), verde (heparina sódica), púrpura (EDTA) ou amarelo (ACD).
- B. Preparo de Amostras de Soro e Plasma
- **Tubos com tampas vermelhas:** Como não há anticoagulante, deve formar um coágulo de glóbulos vermelhos. Remover o coágulo com um aplicador de madeira. Centrifugar o tubo por 10 minutos a 1000 g. Transferir o soro para um tubo limpo.
 - **Tubos com tampas Verdes:** Centrifugar o tubo por 10 minutos a 1000 g. Pipetar o plasma para um tubo de tamanho apropriado. Adicionar ao plasma 1 gota de trombina bovina (10.000 unidades por 6 ml de água esterilizada) por ml de plasma. Misturar bem e remover o coágulo de fibrina. Centrifugar o tubo por 10 minutos a 1000 g. Transferir o soro para um tubo limpo.



- **Tubos com tampas roxas e amarelas:** Centrifugar a amostra por 10 minutos a 1000 g. Pipetar o plasma para um tubo de tamanho apropriado. Adicionar ao plasma 1 gota de cloreto de cálcio (solução 1% em peso) por ml de plasma. Homogeneizar. Adicionar 1 gota de trombina bovina (10.000 unidades por 6 ml de água esterilizada) por ml de plasma. Misturar bem e remover o coágulo de fibrina. Centrifugar o tubo por 10 minutos a 1000 g. Transferir o soro para um tubo limpo.

C. Preparo da Concentração de Trabalho do AHG

1. **Importante:** O laboratório deve caracterizar tanto o AHG quanto o complemento (C') juntos dentro do ambiente local. O AHG deve ser titulado em série, ambos com C' não diluídos e C' diluídos. Estas titulações devem ser realizadas usando diluições seriadas de um aloantígeno HLA conhecido que pode ser efetivamente aumentado pelo procedimento AHG-CDC. Selecionar a combinação de diluições que mais aumenta a citotoxicidade. De preferência, mais do que um anti-soro HLA deve ser usado para estas caracterizações. Para mais informações, consulte Roggero e Crowe².
2. O AHG pode ser usado diluído em meio de cultura (McCoy's ou RPMI) ou pré-misturado com complemento. A diluição do AHG no complemento de coelho elimina a etapa crítica de tempo de AHG que é conhecida por causar resultados falsos negativos quando o AHG é incubado com soro por mais de dois minutos. Para mais informações, consulte Roberts e Fuller³

PROCEDIMENTO

A. Materiais Fornecidos

1. IgG de cabra anti-humana Kappa (cadeias leves livres e ligadas)
2. Instruções de Uso.

B. Materiais necessários, mas não fornecidos

1. Microscópio invertido de contraste de fase com objetiva de 40x
2. Micro seringas
3. Temporizador
4. Caixa de luz / mesa de luz fluorescente
5. Placa Terasaki 50 ou 72- poços
6. Insta-Seal™ (OLI Cat. TIS250U) lamínula ou lâminas e petrolato (Vaseline™)
7. 5% HIFCS McCoy's 5A
8. Reagentes de Coloração e Fixação
 - a. **Para teste de exclusão de coloração:** Eosina Y (sodium base) e formaldeído.
 - b. **Para testes de fluorescência:** FluoroQuench™ AO/EB (OLI Cat. FQAE-500)
9. Controles Positivo e negativo
10. Complemento de coelho
11. Solução de cloreto de cálcio (CaCl₂)
12. Óleo Mineral
13. Trombina bovina
14. Centrífuga Beckman TJ6 ou equivalente
15. Tubos de 5 ml
16. Pipetas
17. Tubos de Beckman
18. Aplicador de madeira

INSTRUÇÕES DE USO

Dois métodos para aplicação de AHG no ensaio de microcitotoxicidade são apresentados aqui. O método B tem a vantagem de pré-misturar o AHG no complemento diluído, o passo crítico de temporização AHG requerido no Método A é eliminado.

- É altamente recomendado que o complemento de coelho seja usado diluído previamente, geralmente 1: 1,5 a 1: 2 em RPMI 1640, dependendo do título. O uso de C' não diluído pode reduzir significativamente o efeito do uso do AHG. Sempre realize testes de validação do seu complemento, não diluído e diluído.
- O AHG deve ser titulado contra um aloanticorpo HLA reativo ao CYNAP conhecido. A diluição ideal do AHG em C' é alcançada quando o aumento está no máximo. Para mais informações, consulte Roberts e Fuller³

A. Método A: (Método Clássico)

1. Preparar a placa de seleção de soro adicionando 1 µl de cada soro a ser testado e soros de controle negativo e

positivo aos poços apropriados de uma placa Terasaki de 60 ou 72 poços e cobrindo os soros com 5 µl de óleo mineral para evitar a evaporação.

2. Ajustar a concentração de linfócitos para 2-3 milhões / ml usando meio de cultura; depois, verifique a viabilidade.
3. Adicionar 1 µl de suspensão celular bem misturada a cada soro de teste e controles.
4. Verificar o contato de células séricas em cada poço (com uma caixa de luz) e usar um misturador de alta frequência para misturar componentes separados. Incubar à temperatura ambiente (20-25°C) durante 30 minutos.
5. Descongelar globulina anti-humana (AHG, armazenada não diluída) e complemento de coelho (C'). Preparar a diluição de trabalho de AHG com RPMI 1640.
6. Após a incubação, dispensar 5 µl de meio (RPMI 1640) em cada poço da placa. Certifique-se de que o fluido de lavagem fique abaixo do óleo e misture bem com o misturador de alta frequência.
7. Colocar as lâminas no suporte da centrífuga; Acelerar a centrífuga a 1000 rpm; manter por 10 segundos e desligar a centrífuga.
8. Flicar o sobrenadante; repetir os passos 6 e 7 três vezes.
9. Adicionar 5 ml de óleo mineral a cada poço.
10. Adicionar 1ml de AHG (diluição de trabalho) a cada poço de teste da lâmina (use caixa de luz) e misture bem. Começar a cronometrar depois que a primeira fileira de poços for preenchida com AHG.
11. Exatamente 2 minutos depois de adicionar o AHG à primeira fileira de poços, adicione 5 ml de coelho C'e misture bem; continue com a próxima linha, etc.

ADVERTÊNCIA: Esperar mais de 2 minutos antes de adicionar o complemento de coelho pode causar reações falso-negativas.

12. Incubar por 60 minutos a 20-25° C.
13. Corar as células usando o método convencional do seu laboratório.
14. Após a coloração, deixar as células assentarem durante 20 a 30 minutos. Verificar os sobrenadantes no poço de controle positivo para linfócitos em suspensão. Se nenhuma célula estiver visível, leia a (s) placas(s).

B. Método B (AHG Pré-Misturado com Complemento)

Este método é recomendado por Thomas C. Fuller, PhD por conveniência e para melhorar a precisão do procedimento AHG-CDC.

Cuidado: Antes de usar o AHG diluído no complemento, realize a validação interna do AHG com seu complemento para sensibilidade / especificidade.

1. Preparar uma mistura de AHG / e complemento usando suas diluições pré-determinadas para o AHG e complemento.
2. Siga os passos 1-9 acima.
3. Adicionar 5 µl da mistura AHG / C'a cada poço de teste.
4. Incubar por 60 minutos a 20-25° C.
5. Corar as células usando o método convencional do seu laboratório.

RESULTADOS

O AHG aumentará a reatividade citotóxica dos aloanticorpos HLA Classe I pelo menos de duas a três vezes, ou mais, dependendo do aloantisoro.

LIMITAÇÕES DOS PROCEDIMENTOS

A qualidade do complemento é um fator no aumento bem-sucedido da citotoxicidade. Este reagente não aumenta a citotoxicidade dos anticorpos com cadeias leves lambda.

ISENÇÃO DE RESPONSABILIDADE

Somente para uso em pesquisa. Este produto não tem a intenção de fornecer informação para diagnóstico, prevenção ou tratamento de doença ou de ajuda no processo de tomada de decisão clínica. Este produto não está liberado ou aprovado.

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
Não passível de regulamentação.

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

EXPLICAÇÃO DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
	Número do Catálogo
	Dispositivo médico de diagnóstico in vitro
	Consulte as instruções de uso
	Cuidado, consulte os documentos que acompanham
	Riscos Biológicos
	Limitação da Temperatura
	Marca CE
	Fabricante

HISTÓRICO DE REVISÃO

Revisão	Data	Descrição da Revisão
01	08/04/2019	Melhoria no sistema de Controle de Documentos Internos. Nenhuma alteração no conteúdo do documento.
02	20/09/2019	Atualizado as informações de contato e endereço para refletir a mudança no local fabricação legal.
03	Atual	Alterado para novo formato. Removido Stain Fix – ref. SF-500. Inclusão do representante brasileiro autorizado.