

KIT CMV BRITE TURBO – ANTIGENEMIA

MÉTODO: IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANTÍGENO pp65

I. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE LEUCÓCITOS

- 1 - Reagente A 1:10 em água destilada e resfriamento a 4°C (10 ml solução A + 90 ml de H₂O – solução de lise eritrocitária)
- 2 - Misturar 1ml de sangue com 15 ml de solução de lise de eritrócitos resfriada a 4°C em tubo de 15 ml e incubar por 5 a 10 min a 4°C. (Em pacientes com neutropenia e transplantados de medula óssea, fazer 2 tubos por paciente)
- 3 - Centrifugar por 2min a 2500rpm. Desprezar sobrenadante.
- 4 - Repetir o passo de lise eritrocitária se a primeira lise for insuficiente.
- 5 - Ressuspender o pellet em 5 ml de PBS.
- 6 - Centrifugar por 2 min a 2500 rpm. Desprezar o sobrenadante.
- 7 - Ressuspender o pellet em 0,5 ml de PBS (em pacientes com neutropenia severa pode-se suspender em até um mínimo de 0,2ml)

II. CONTAGEM CELULAR

- Ajustar a concentração em 2x10⁶ células por ml com PBS. (Em câmara de Neubauer contar \pm 20 células (leucócitos).

III. PREPARAÇÃO DE LÂMINAS DE CITOCENTRIFUGADO

- Centrifugar 100 µl da suspensão celular a 600 RPM por 4 minutos em lâminas de vidro na citocentrífuga.
- Secar as lâminas por 20 minutos
- Circundar o citocentrifugado com caneta hidrofóbica
- As lâminas podem permanecer overnight antes da fixação e coloração.

IV. FIXAÇÃO E PERMEABILIZAÇÃO

- 1 - Diluir o fixador (reag. B) 1:5 em PBS em frasco escuro antes de usar (40 ml PBS + 10 reag.B)
- 2 - Diluir a solução de permeabilização (reag.C) 1:5 em PBS em frasco escuro (40 ml PBS/ 10 ml reg. C - não reutilize)
- 3 - Colocar em imersão as lâminas no fixador (reg. B) diluído, por 5 minutos a temperatura ambiente em câmara escura.
- 4 - Lavar as lâminas 3 vezes em PBS (solução de lavagem) e deixar no PBS por 3 minutos.
- 5 - Colocar as lâminas em imersão na solução de permeabilização (reag C diluído) por 1 minuto em temperatura ambiente
- 6 - Lavar as lâminas 3x em PBS e deixar em solução fresca por 5 min. (máximo 60min.).

V. ARMAZENAMENTO DAS LÂMINAS

- Secar por 20 minutos a temperatura ambiente.
- Embalar em papel laminado congelar a – 20°C (quando for usar rehidratar por 5 min com PBS).

VI. COLORAÇÃO POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

- 1 – Rehidratar a lâmina controle em PBS por 1 a 2 min. Não permitir que as lâminas sequem durante a coloração.
- 2 – Remover 1 lâmina por vez da solução de lavagem, e secar cuidadosamente a área que circunda o citocentrifugado.
- 3 – Aplicar 35 µl de C10/11 anticorpo monoclonal primário (reg.D) e incubar por 20min a 37⁰ em câmara úmida.
- 4 – Mergulhar as lâminas 3x em solução de lavagem (PBS) e deixar por 3 min em solução fresca.
- 5 – Remover uma lâmina por vez da solução de lavagem e secar cuidadosamente a área circundante do citocentrifugado.
- 6 – Aplicar 35 µl do conjugado (reag E) e incubar por 20 min a 37⁰ em câmara úmida.
- 7 – Lavar 2x em PBS fresco, retirar o excesso de PBS batendo a lâmina em papel absorvente.
- 8 – Montar com glicerina tamponada diluída (35 ml de Glicerina + 15 ml de PBS) e cobrir com lamínula.

VII. LEITURA DAS LÂMINAS

- Realizar a leitura assim que possível. As lâminas podem ser estocadas a 4⁰ em câmara fechada.
- Ler toda a lâmina. Células positivas mostram coloração verde-amarelada no núcleo polilobulado da célula.