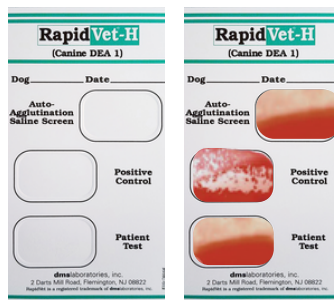


1. Extrair o sangue do paciente em **tubo com EDTA**. Não utilizar Citrato de Sódio. O teste requer apenas 150 uL de sangue total, mas o tubo deve ser preenchido de modo que o EDTA fique com concentração adequada.
2. Remova o cartão de teste da embalagem plástica.
3. Identifique o cartão com os dados do paciente.
4. Coloque o cartão de teste em uma superfície plana.
5. Ao usar cartões RapidVet-H para realizar a tipagem, o primeiro passo é testar a amostra do paciente quanto à auto aglutinação usando o poço “Auto-Aglutination Saline Screen” no cartão.
6. Dispense 1 gota de diluente (40uL) do frasco tampão no poço “Auto-Aglutination Saline Screen”.
7. Aspire uma pequena quantidade do sangue homogeneizado do paciente com o auxílio da pipeta de Pasteur e goteje 1 gota (50 uL) no poço “Auto-Aglutination Saline Screen”.
8. Com o misturador, homogeneíze levemente os materiais dentro da marcação do poço (Atenção: preencher todo o espaço dentro da linha preta), por cerca de 10 segundos.
9. Movimente o cartão, em movimento transaxial, homogeneizando e girando o material dentro do poço, por no máximo 60 segundos.
10. Inclinar o cartão a um ângulo de 10° para uma melhor leitura.
11. Se a auto-aglutinação **NÃO** ocorrer, prossiga para a próxima etapa. (Obs. Caso ocorra auto-aglutinação, **PARAR** o teste e realizar a lavagem de eritrócitos antes de prosseguir -técnica disponível no final deste folheto).
12. Dispense 1 gota de diluente (40uL) do frasco tampão em cada um dos 2 poços restantes.
13. Aspire uma pequena quantidade do sangue homogeneizado do paciente com o auxílio da pipeta de Pasteur e goteje 1 gota (50 uL) no poço “Positive Control”. Com o auxílio de um novo misturador, homogeneíze levemente os materiais dentro da marcação do poço (**Atenção: preencher todo o espaço dentro da linha preta**), por cerca de 10 segundos.
14. Novamente, aspire uma pequena quantidade do sangue homogeneizado do paciente com o auxílio da pipeta de Pasteur e goteje (50 uL) no poço “Patient Test”. Com o auxílio de um novo misturador, homogenize levemente os materiais dentro da marcação do poço (**Atenção: preencher todo o espaço dentro da linha preta**) por cerca de 10 segundos
15. Movimente o cartão, em movimento transaxial, por no máximo 1 minuto, homogeneizando e girando o material dentro do poço. **Cuidado para não misturar material de um poço para outro.** Obs. A aglutinação é uma ligação eletrostática entre eritrócitos e anticorpos, por isso é reversível. Se a aglutinação aparece e desaparece ou se o operador estiver em dúvida se o que vê é aglutinação ou não, deverá adicionar uma segunda gota de diluente e, SEM UTILIZAR O MISTURADOR, somente movimente o cartão por mais 30 segundos antes de ler o resultado. Isso irá potencializar a reação se o cão for DEA 1+.
16. Inclinar o cartão a um ângulo de 10° para leitura dos resultados e anotar os poços em que ocorreram aglutinações. Depois que o cartão for lido, recomenda-se digitalizar a imagem do cartão para ter um registro permanente.
17. Se o teste foi executado corretamente, haverá aglutinação no poço “Positive Control”, se não houver nenhuma aglutinação no “Positive Control” o teste não foi executado corretamente.
18. RESULTADO:
Se ocorrer aglutinação no poço “Patient Test”, o cão é DEA 1 (+) positivo. Informar também o grau de aglutinação - fraco a forte).
Se não houver aglutinação no poço “Patient Test”, o cão é DEA 1 (-) negativo.



Ex. de resultado:
cão DEA1 (-)

ATENÇÃO



- A amostra de sangue total com EDTA pode ser utilizada até 24 horas pós-colheita, e deve ser mantida entre 2 a 8° C. A amostra deve estar em temperatura ambiente para realização do teste.
- Qualquer aparência granular fina desenvolvida após 1 minuto deve ser desconsiderada na determinação dos resultados.
- A velocidade de aglutinação e o tamanho dos aglomerados de um cão DEA 1+ podem ser diferentes do poço "Positive Control".
- Se o cão estiver muito anêmico, o padrão de aglutinação pode ser pequeno e discreto.

LAVAGEM DE HEMÁCIAS

Se a amostra do paciente auto aglutinou, as células vermelhas deverão ser lavadas antes de prosseguir com o teste de Tipagem sanguínea RapidVet-H. Para a lavagem utilizar PBS – Salina Tamponada.

NÃO utilizar o diluente PBS incluído no kit do teste.

TÉCNICA

1. Centrifugar a amostra de sangue 1000xg ou 2300 RPM por 3 minutos.
2. Descartar o sobrenadante utilizando uma pipeta limpa.
3. Adicionar no sedimento das hemácias, Salina Fosfatada Tamponada a pH 7.0-7.4 (PBS), na proporção 1:1.
4. Homogeneizar delicadamente.
5. Centrifugar por aproximadamente 30-60 segundos.
6. Descartar sobrenadante com uma pipeta.
7. Repetir os itens 3, 4, 5 e 6 aproximadamente 3 vezes.
8. Misturar as células na proporção 1:1 com PBS.
9. Repetir o teste no poço de auto aglutinação. Se auto aglutinar, repetir o procedimento de lavagem mais uma vez. Se a auto aglutinação persistir, pode não ser possível determinar definitivamente o tipo sanguíneo do animal. Se não auto aglutinar proceder com o teste de tipagem.

