

1. Extrair o sangue do paciente em **tubo com EDTA**. Não utilizar Citrato de Sódio. O tubo deve ser preenchido de modo que o EDTA fique com concentração adequada.

Preparação da Amostra do Paciente

- Coletar sangue do paciente em seringa ou tubo de tampa roxa contendo EDTA como anticoagulante. A seringa ou o tubo devem ser preenchidos completamente para garantir concentração adequada de EDTA. Se a tipagem sanguínea não for realizada imediatamente, não adicionar conservantes como CPDA. Não utilizar heparina.
- Centrifugar o sangue total com EDTA por 10 minutos. Desprezar o sobrenadante (plasma). Manter apenas os eritrócitos.
- Em um tubo limpo, dispensar no mínimo 100 uL (0,1 mL) de eritrócitos. Adicionar solução salina estéril, no mesmo volume que os eritrócitos adicionados. Homogeneizar bem. **Esta é a amostra do paciente.**

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 2 gotas de diluente (80uL) do frasco tampão no poço “Auto-Aglutination Saline Screen”.

7. Homogeneizar delicadamente a amostra do paciente (eritrócitos + solução salina). Aspire uma pequena quantidade da amostra do paciente com 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 aproximadamente 30 segundos e observar a SE HOUVE aglutinação.

10. Colocar o cartão sobre superfície plana e adicionar 1 gota de diluente (40 µL). **NÃO MISTURAR**. Girar novamente o cartão por 30 segundos em movimento transaxial e observar SE HOUVE aglutinação.

11. Inclinar o cartão a um ângulo de 10° para uma melhor leitura.

12. 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).

13. Dispense 2 gotas de diluente (80uL) do frasco tampão em cada um dos 2 poços restantes.

14. Aspire uma pequena quantidade da amostra preparada 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.

15. Novamente, aspire uma pequena quantidade da amostra preparada 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

16. Movimente o cartão, em movimento transaxial, por no máximo 1 minuto, girando o material dentro do poço. **Cuidado para não misturar material de um poço para outro.**

17. Inclinar o cartão a um ângulo de 10° a 20° e permitir que as amostras sedimentem no fundo dos poços por 60 segundos.

18. Colocar o cartão sobre superfície plana e ADICIONAR 1 gota de diluente (40 µL) em ambos os poços. **NÃO MISTURAR**. Girar o cartão em movimento transaxial por 30 segundos. Posicionar o cartão em ângulo de 10–20° e permitir sedimentação por 30 segundos..

19. RESULTADO:

Ler os resultados e registrar os poços onde ocorreu aglutinação. Se o teste foi realizado corretamente, deve ocorrer aglutinação visível no poço “Positive Control”. Se não houver aglutinação no controle, o teste não foi executado corretamente.

!IMPORTANTE!
Antes de usar esse guia rápido,
leia atentamente as instruções de
uso que acompanham o kit.

• Se a amostra do paciente apresentar aglutinação no poço “Patient Test” e não houver autoaglutinação, o paciente é DEA 1 positivo.

• Se não houver aglutinação visível no poço “Patient Test”, o paciente é DEA 1 negativo.

Recomenda-se registrar os resultados não apenas como DEA 1+ ou DEA 1-, mas também o grau de aglutinação (fraca a forte). Qualquer aparência granular fina que se desenvolva mais de 1 minuto após a leitura deve ser desconsiderada. A velocidade da aglutinação e o tamanho dos agregados celulares podem diferir do poço “Positive Control”. Diferentemente dos humanos, um animal pode possuir mais de um tipo sanguíneo primário. Nesses casos, os eritrócitos carregarão antígenos de cada tipo, resultando em menor quantidade de antígenos DEA 1 do que em animais que possuem apenas DEA 1 como tipo primário. Se o paciente for muito anêmico, o padrão de aglutinação pode aparecer como pequenas agregações discretas semelhantes à cabeça de um alfinete, em vez de aglutinação grosseira.

20. Após leitura do cartão, realizar uma fotografia digital para registro permanente.

ATENÇÃO



- A amostra de sangue total com EDTA (antes da centrifugação) 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.
- A amostra do paciente (diluída com solução salina) deve ser utilizada logo após o preparo.
- 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.

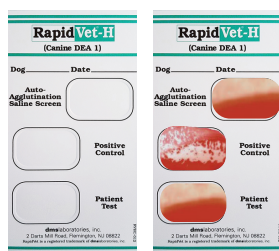
LAVAGEM DE HEMÁCIAS

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.



Ex. de resultado:
cão DEA1 (-)

