

Primeiro, determinar o número de poços a testar:

São necessários dois poços para o Controlo Negativo.

São necessários dois poços para o reagente controlo do lisado.

São necessários dois poços para cada amostra a ser testada (pré, pós, actual, etc.)

1. Cálculo para determinar o número total de poços a serem testados quer para a Classe I quer para a Classe II:

$$\frac{4}{(\text{Poços Controlo})} + \frac{\text{Poços das Amostras}}{\text{Poços das Amostras}} + \frac{2}{(\text{Perdas na pip.})} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de poços}}{\text{N}^\circ \text{ total de poços}} \times \frac{15 \mu\text{L}}{(\text{Vol/Poço})} = \frac{\mu\text{L (a)}}{(\text{Vol de Lisado diluído nec.})}$$

De seguida, determinar a quantidade de lisado não diluído necessária.

2. Cálculo para determinar a quantidade de lisado não diluído necessária para as tiras Classe I:

Dividir o volume total de lisado diluído por 8 para determinar a quantidade de lisado não diluído necessária para as tiras Classe I.

$$\frac{\mu\text{L (a)}}{(\text{Vol de lisado diluído nec.})} \div \frac{8}{(\text{Diluição Classe I})} = \frac{\mu\text{L (b)}}{(\text{Vol de lisado não diluído nec. para as tiras Classe I})}$$

3. Cálculo para determinar a quantidade de lisado não diluído necessária para as tiras Classe II:

Dividir o volume total de lisado diluído por 4 para determinar a quantidade de lisado não diluído necessária para as tiras Classe II.

$$\frac{\mu\text{L (a)}}{(\text{Vol de lisado diluído nec})} \div \frac{4}{(\text{Diluição Classe II})} = \frac{\mu\text{L (c)}}{(\text{Vol de lisado não diluído nec. para as tiras Classe II})}$$

4. Cálculo para determinar a quantidade total de lisado para as tiras Classe I e Classe II:

Adicionar o volume de lisado não diluído necessário para as tiras Classe I e Classe II para determinar o volume total de lisado não diluído necessário.

$$\frac{\mu\text{L (b)}}{(\text{Classe I})} + \frac{\mu\text{L (c)}}{(\text{Classe II})} = \frac{\mu\text{L (d)}}{(\text{Vol Total de Lisado Não diluído necessário})}$$

5. A partir do volume total de lisado não diluído necessário, determinar o volume de concentrado de células a preparar:

$$\frac{\mu\text{L (d)}}{(\text{Vol de lisado não diluído nec.})} \div \frac{10}{(\text{Diluição de Lise})} = \frac{\mu\text{L (e)}}{(\mu\text{L de concentrado de Linfócitos})}$$

Nota: 30 µL de concentrado de células ou cerca de 90 x 10⁶ células fornecem lisado suficiente para testar amostras de 20 pacientes em duplicado para reactividade de ambas as Classes I e II.

10 µL de concentrado de células ou cerca de 30 x 10⁶ fornecem lisado suficiente para testar amostras de 20 pacientes em duplicado apenas contra as tiras da Classe I.

20 µL de concentrado de células ou cerca de 60 x 10⁶ 10⁶ fornecem lisado suficiente para testar amostras de 20 pacientes em duplicado apenas contra as tiras da Classe II.

Registo das diluições:

Volume de concentrado de células utilizado (e) _____

Volume de Tampão de Lise Linfocitária diluído adicionado _____ (100 µL / 10 µL volume de concentrado de células)

Registo da Diluição para o Lisado Classe I:

Registo da Diluição para o Lisado Classe II:

Volume Total de Lisado Classe I Diluído (a) _____ Volume Total de Lisado Classe II Diluído (a) _____

Volume de lisado não diluído utilizado (b) _____ Volume de lisado não diluído utilizado (c) _____

Volume LCD utilizado (a-b) _____ Volume LCD utilizado (a-c) _____