

## 12. Separação da capa flogística

1. Coletar sangue em frasco com anticoagulante e manter refrigerado. A amostra não deverá apresentar nenhum coágulo.
2. Para a realização desta técnica é utilizado tampão de lise de hemácias (pH 7,4), sempre aferir o pH antes de iniciar os procedimentos.
3. Com o auxílio de uma pipeta, mensurar o volume de sangue da amostra, transferindo o mesmo para um tubo de rotina estéril.
4. Adicionar, no frasco com sangue, o tampão de lise de hemácias na quantidade de 2,5 vezes o volume de sangue.
5. Os frascos tampados devem ser centrifugados a 4°C, por 10 minutos, em 3500 rpm.
6. Após centrifugação, desprezar o sobrenadante, mantendo o *pellet* celular (capa flogística) no fundo do frasco.
7. Adicionar, cuidadosamente, 1mL de tampão de lise de hemácias para lavar a capa flogística.
8. Remover a solução e adicionar 1mL de MEM para ressuspender as células. Transferir esta suspensão para microtubos identificados.
9. Manter os microtubos apenas refrigerados para evitar lise celular.
10. Para inoculação, utilizar placas previamente preparadas com células susceptíveis. Remover o sobrenadante e inocular a capa flogística (co-cultivo).

### Reagentes e Soluções:

1. Tampão de Hemólise (pH 7,4)

Reagentes	Quantidade (gramas)
NH <sub>4</sub> Cl	4,14
KHCO <sub>3</sub>	0,5
EDTA	0,18
H <sub>2</sub> O milliQ estéril qsp	500mL