



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - NAPAT

POP NAPAT LAB IMF 001 TÉCNICA DE IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA



POP NAPAT LAB IMF 001 - PÁG.: 1/6 EMISSÃO: 24/02/2022 REVISÃO Nº :

1. OBJETIVO:

Utilização de técnicas imunoenzimáticas para observação de tecido em microscópio de luz (UV) para identificação das características moleculares de certas patologias.

2. ABRANGÊNCIA:

Equipe Técnica do Laboratório de imunofluorescência.

3. MATERIAL E DOCUMENTOS NECESSÁRIOS:

3.1. Equipamentos de Proteção Individual (EPI's): avental descartável, luvas de procedimento, máscara descartável PFF2 dotada de filtro de carvão ativo e óculos de proteção.

3.2. Materiais Específicos para o Procedimento: sais, reagentes, livro de registro, pinça, papel alumínio, vidraria, microtubo de 2ml, lâmina de vidro, lamínula e vidro, água destilada, navalha descartável, papel-filtro, etiqueta adesiva, bancada rígida, equipamento para corte das amostras, estufa, geladeira, balança de precisão, microscópio de luz (UV), microcomputador e impressora para etiquetas.

4. PROCEDIMENTOS:

4.1. Realizar a higienização das mãos com água e sabão antisséptico (mínimo 30 segundos) ou álcool em gel (mínimo 15 segundos);

4.2. Vestir o avental, máscara descartável PFF2 dotada de filtro de carvão ativo, óculos de proteção e luvas de procedimento;

4.3. Receber o tecido para exame, que deve estar acondicionado em frasco com solução apropriada para sua conservação (meio de Michel);

4.4. Registrar o exame no livro de registro;

4.5. Identificar o frasco onde está acondicionado o tecido com a numeração interna do laboratório;

4.6. Manter o frasco onde está acondicionado o tecido, em geladeira, até o momento de realização do exame;

Obs. O tecido pode ser mantido em geladeira, desde que esteja acondicionado em meio de Michel, por até 07 dias;



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - NAPAT

POP NAPAT LAB IMF 001 TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA



POP NAPAT LAB IMF 001 - PÁG.: 2/6 EMISSÃO: 24/02/2022 REVISÃO Nº :

- 4.7. Retirar o tecido acondicionado em meio de Michel com o auxílio de uma pinça de ponta fina;
- 4.8. Colocar o tecido em frasco apropriado contendo 20 ml de solução salina tamponada em temperatura ambiente, por 15 minutos;
- 4.9. Retirar o tecido submerso em solução salina tamponada com o auxílio de uma pinça;
- 4.10. Colocar o tecido sobre uma folha de papel-filtro, para absorção do excesso do líquido;
- 4.11. Identificar a lâmina de vidro onde será aderido o tecido com o número do exame do paciente;
- 4.12. Seguir com a técnica para cortes congelados conforme POP NAPAT HISTO 002 – CONGELAÇÃO;
- 4.13. Colocar a lâmina de vidro (onde está aderido o tecido) em frasco apropriado contendo 20ml de solução salina tamponada em temperatura ambiente, por 10 minutos;
- 4.14. Retirar da solução salina tamponada e deixar ao ar do ambiente para secar;
- 4.15. Delimitar o tecido aderido à lâmina de vidro com um fino traço, utilizando esmalte de unha;
- 4.16. Deixar ao ar do ambiente para secar;
- 4.17. Micropipetar o reagente (Avidina) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;
- 4.18. Incubar em câmara úmida por 20 minutos em temperatura ambiente;
- 4.19. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;
- 4.20. Enxugar a lâmina em papel-filtro;
- 4.21. Micropipetar o reagente (Biotina) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;
- 4.22. Incubar em câmara úmida por 20 minutos em temperatura ambiente;
- 4.23. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;
- 4.24. Enxugar a lâmina em papel-filtro;
- 4.25. Micropipetar o reagente (Anticorpo Primário) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;
- 4.26. Incubar em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente;
- 4.27. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;
- 4.28. Enxugar a lâmina em papel-filtro;

Aprovação: Diretor do Serviço / Gerência de Diretor do Núcleo: Dr. Marcelo Padovani de Toledo Moraes e Adriana de Fátima Souza Gonçalves

Assessoria do Núcleo de Gestão da Qualidade | Aprovação CCIAS / Sesmt / Núcleo de Higienização: Prof. Assoc. Carlos Magno C. B. Fortaleza / Eng.º Fabio Suraci Picchiotti / En.ª Juliana da Silva Barbosa



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - NAPAT

POP NAPAT LAB IMF 001 TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA



POP NAPAT LAB IMF 001 - PÁG.: 3/6 EMISSÃO: 24/02/2022 REVISÃO Nº :

- 4.29. Micropipetar o reagente (Anticorpo Secundário) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;
- 4.30. Incubar em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente;
- 4.31. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;
- 4.32. Enxugar a lâmina em papel-filtro;
- 4.33. Micropipetar o reagente (Fluoresceína) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;
- 4.34. Incubar em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente;
- 4.35. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente, por 5 minutos;
- 4.36. Enxugar a lâmina em papel-filtro;
- 4.37. Colocar lamínula sobre a lâmina, utilizando glicerina tamponada com azul de evans 0,1% (processo de montagem);
- 4.38. Rotular a lâmina com a etiqueta de identificação do exame do paciente;
- 4.39. Entregar ao médico patologista para observação em microscópio de luz (UV) e finalização diagnóstica;
- 4.40. Retirar as luvas e avental, descartar em lixo branco;
- 4.41. Realizar a higienização das mãos com água e sabão antisséptico (mínimo 30 segundos) ou álcool em gel (mínimo 15 segundos);
- 4.42. Retirar o respirador descartável PFF2 dotado de camada de carvão ativado, sem válvula e os óculos de segurança;
- 4.43. Realizar a higienização das mãos com água e sabão antisséptico (mínimo 30 segundos) ou álcool em gel (mínimo 15 segundos);
- 4.44. Seguir com a higienização dos óculos, conforme a orientação do Serviço Especializado em Engenharia de Segurança e em Medicina do Trabalho (SESMT);
- 4.45. Realizar higienização das mãos com água e sabão antisséptico (mínimo 30 segundos) ou álcool em gel (mínimo 15 segundos).

→ PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

- **Meio de Michel**

Tampão para diluição do Sulfato de Amônia (200ml)

Aprovação: Diretor do Serviço / Gerência de Diretor do Núcleo: Dr. Marcelo Padovani de Toledo Moraes e Adriana de Fátima Souza Gonçalves

Assessoria do Núcleo de Gestão da Qualidade | Aprovação CCIRAS / Sesmt / Núcleo de Higienização: Prof. Assoc. Carlos Magno C. B. Fortaleza / Eng.º Fabio Suraci Picchiotti / En.ª Juliana da Silva Barbosa



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - NAPAT

POP NAPAT LAB IMF 001 TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA



POP NAPAT LAB IMF 001 - PÁG.: 4/6 EMISSÃO: 24/02/2022 REVISÃO Nº :

- Citrato de Sódio (1M) Pm.330.....1,65g para 5ml de H₂O destilada
- Sulfato de Magnésio (0,1M) Pm.372.....0,372g para 10ml de H₂O destilada
- N-Etilmaleimida (0,1M) Pm.125,13.....0,125g para 10ml de H₂O destilada
- Ajustar o volume para 200ml de H₂O destilada e ajustar o pH em 7,0 com KOH (1M)
- Diluir 55g de Sulfato de Amônia para cada 100ml do tampão acima

● Solução Salina Tamponada pH7,2

- Cloreto de Sódio.....8,17g
- Fosfato de Sódio Monobásico Anidro.....0,36g
- Fosfato de Sódio Dibásico1,05g
- Água Destilada q.s.p.....1,00L

● Solução Azul de Evans 0,1%

- Corante Azul de Evans0,1g em 100ml de Solução Salina Tamponada

● Reagentes

- Anticorpo Anti- humano C4d.....1:100
- Solução bloqueadora Avidina / Biotina pronto/uso
- Diluente pronto/uso

5. CONTINGÊNCIAS:

Não é possível a realização do exame, sem que o tecido tenha sido acondicionado apropriadamente em frasco com solução para sua conservação (meio de Michel), fixadores como formol, dentre outros, inviabilizam a realização do exame.

6. OBSERVAÇÕES:

6.1. Após a colheita do tecido, este deve ser encaminhado o mais rápido possível ao Laboratório de Imunofluorescência, devidamente acondicionado conforme descrito.

Aprovação: Diretor do Serviço / Gerência de Diretor do Núcleo: Dr. Marcelo Padovani de Toledo Moraes e Adriana de Fátima Souza Gonçalves

Assessoria do Núcleo de Gestão da Qualidade | Aprovação CCIRAS / Sesmt / Núcleo de Higienização: Prof. Assoc. Carlos Magno C. B. Fortaleza / Eng.º Fabio Suraci Picchiotti / En.ª Juliana da Silva Barbosa



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - NAPAT

POP NAPAT LAB IMF 001 TÉCNICA DE IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA



POP NAPAT LAB IMF 001 - PÁG.: 5/6 EMISSÃO: 24/02/2022 REVISÃO Nº :

6.2. Os óculos de segurança devem ser lavados com água e sabão neutro e secado com papel macio e, apenas em casos de procedimentos de assistência com pacientes de isolamento e/ou projeção de secreções e líquidos biológicos, após a secagem, deve ser utilizado álcool 70° ou de quaternário de amônia. Em ambos os casos, após a lavagem, evitar friccionar o papel para secagem nas lentes, de maneira a prevenir riscos.

6.3. Retirar os óculos de segurança, SOMENTE, ao término de todo procedimento, inclusive descarte e lavagem de materiais utilizados, devendo este ser higienizado separadamente.

7. AUTORES E REVISORES

7.1. Autores / Colaboradores – Claudinei Jurandir Figueira e Marcos Roberto Franchi.

7.2. Revisores – Claudinei Jurandir Figueira e Marcos Roberto Franchi.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Gyongyi M Nadasdy et al.
- Human pathology, 36(11), 1178-1185 (2005-11-02)
- Detection of peritubular capillary (PTC) C4d deposition in tissue sections of renal allograft biopsies became an important aid in the diagnosis of antibody-mediated rejection. Pathologists in many major transplant centers now routinely stain renal allograft biopsies for C4d. Currently, there.
- BRASIL Ministério do Trabalho e Emprego. Norma Regulamentadora nº 32 (Segurança e Saúde no Trabalho em Estabelecimentos de Saúde). Portaria MTB 3.214 de 08 de junho de 1978.



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO DO NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLÓGICA - NAPAT

POP NAPAT LAB IMF 001 TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA



POP NAPAT LAB IMF 001 - PÁG.: 6/6 EMISSÃO: 24/02/2022 REVISÃO Nº :

9. TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO ELETRÔNICA E APROVAÇÃO DE DOCUMENTO

	<p>HOSPITAL DAS CLÍNICAS FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU NÚCLEO DE GESTÃO DA QUALIDADE Av. Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, s/n CEP 18618-687 – Botucatu – São Paulo – Brasil Tel. (14) 3811-6218 / (14) 3811-6215 – E-mail qualidade.hcfmb@unesp.br</p>	
TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO ELETRÔNICA E APROVAÇÃO DE DOCUMENTO		

1. IDENTIFICAÇÃO DO DOCUMENTO		
1.1. Título: POP NAPAT LAB IMF 001 – TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA		
1.2. Área Responsável: NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLOGIA – NAPAT		
1.3. Data da Elaboração: 24/02/2022 – Total de páginas: 06 Data da Revisão: ___/___/___ Número da Revisão: ___		
1.4. Autorização de Divulgação Eletrônica do Documento e Consentimento de Exposição de dados (nome completo e número de registro profissional) durante a vigência do documento: Eu, como autor e/ou revisor do documento citado, aprovo e autorizo a divulgação eletrônica do mesmo:		
NOME	SETOR	ASSINATURA
Claudinei Jurandir Figueira	Núcleo de Anatomia Patológica – NAPAT	
Marcos Roberto Franchi.	Núcleo de Anatomia Patológica – NAPAT	
2. DECLARAÇÃO DE CIÊNCIA, APROVAÇÃO DE DOCUMENTO E CONSENTIMENTO DE EXPOSIÇÃO DO NOME COMPLETO (DURANTE O PERÍODO DE VIGÊNCIA DO DOCUMENTO):		
Declaro que estou ciente e aprovo o conteúdo do documento: POP NAPAT LAB IMF 001 – TÉCNICA DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA		
Também autorizo a exposição do meu nome completo.		
Data: 11/04/2022	Nome Completo Diretor: Dr. Marcelo Padovani de Toledo Moraes	
	Assinatura:	

Aprovação: Diretor do Serviço / Gerência de Diretor do Núcleo: Dr. Marcelo Padovani de Toledo Moraes e Adriana de Fátima Souza Gonçalves