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. MATERIAIS E RECURSOS NECESSÁRIOS:

3.1. Equipamentos de Proteção Individual (EPI's): Equipe Técnica do Laboratório de imunofluorescência.

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

1. Realizar a higienização das mãos com água e sabão antisséptico (mínimo 30 segundos) ou álcool em gel (mínimo 15 segundos);
2. Vestir o avental, máscara descartável PFF2 dotada de filtro de carvão ativo, óculos de proteção e luvas de procedimento;
3. Receber o tecido para exame, que deve estar acondicionado em frasco com solução apropriada para sua conservação (meio de Michel);
4. Registrar o exame no livro de registro;
5. Identificar o frasco onde está acondicionado o tecido com a numeração interna do laboratório;
6. Manter o frasco onde está acondicionado o tecido, em geladeira, até o momento de realização do exame;
7. **Obs.** O tecido pode ser mantido em geladeira, desde que esteja acondicionado em meio de Michel, por até 07 dias;
8. Retirar o tecido acondicionado em meio de Michel com o auxílio de uma pinça de ponta fina;

9. Colocar o tecido em frasco apropriado contendo 20 ml de solução salina tamponada em temperatura ambiente, por 15 minutos;

10. Retirar o tecido submerso em solução salina tamponada com o auxílio de uma pinça;

11. Colocar o tecido sobre uma folha de papel-filtro, para absorção do excesso do líquido;

12. Identificar a lâmina de vidro onde será aderido o tecido com o número do exame do paciente;

13. Seguir com a técnica para cortes congelados conforme **POP NAPAT HISTO 002** – CONGELAÇÃO;

14. 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;

15. Retirar da solução salina tamponada e deixar ao ar do ambiente para secar;

16. Delimitar o tecido aderido à lâmina de vidro com um fino traço, utilizando esmalte de unha;

17. Deixar ao ar do ambiente para secar;

18. Micropipetar o reagente (Avidina) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;

19. Incubar em câmara úmida por 20 minutos em temperatura ambiente;

20. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;

21. Enxugar a lâmina em papel-filtro;

22. Micropipetar o reagente (Biotina) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;

23. Incubar em câmara úmida por 20 minutos em temperatura ambiente;

24. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;

25. Enxugar a lâmina em papel-filtro;

26. Micropipetar o reagente (Anticorpo Primário) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;

27. Incubar em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente;

28. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;

29. Enxugar a lâmina em papel-filtro;

30. Micropipetar o reagente (Anticorpo Secundário) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;

31. Incubar em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente;

32. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente por 5 minutos;

33. Enxugar a lâmina em papel-filtro;

34. Micropipetar o reagente (Fluoresceína) pré-diluído que será colocado sobre o tecido;

35. Incubar em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente;

36. Lavar em solução salina tamponada em temperatura ambiente, por 5 minutos;

37. Enxugar a lâmina em papel-filtro;

38. Colocar lamínula sobre a lâmina, utilizando glicerina tamponada com azul de evans 0,1% (processo de montagem);

39. Rotular a lâmina com a etiqueta de identificação do exame do paciente;

40. Entregar ao médico patologista para observação em microscópio de luz (UV) e finalização diagnóstica;

41. Retirar as luvas e avental, descartar em lixo branco;

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

43. Retirar o respirador descartável PFF2 dotado de camada de carvão ativado, sem válvula e os óculos de segurança;

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

45. Seguir com a higienização dos óculos, conforme a orientação do Serviço Especializado em Engenharia de Segurança e em Medicina do Trabalho (SESMT);

46. Realizar higienização das mãos com água e sabão antisséptico (mínimo 30 segundos) ou álcool gel (mínimo 15 segundos).

➢ PREPARO DAS SOLUÇÕES E REAGENTES

1. Meio de Michel

Tampão para diluição do Sulfato de Amônia (200ml)

- Citrato de Sódio (1M) Pm.330……1,65g para 5ml de H_2O destilada
- Sulfato de Magnésio (0,1M) Pm.372…….0,372g para 10ml de H_2O destilada
- N-Etilmaleimida (0,1M) Pm.125,13……..……..0,125g para 10ml de H_2O destilada
- Ajustar o volume para 200ml de H_2O 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**

1. Cloreto de Sódio…….8,17g

2. Fosfato de Sódio Monobásico Anidro…….0,36g

3. Fosfato de Sódio Dibásico ……...1,05g

4. Água Destilada q.s.p……...1,00L

- **Solução Azul de Evans 0,1%**

5. Corante Azul de Evans ……...0,1g em 100ml de Solução Salina Tamponada

- **Reagentes**

✓ Anticorpo Anti- humano C4d……1:100

✓ Solução bloqueadora Avidina / Biotina pronto/uso

✓ Diluente pronto/uso

5. CONTINGÊNCIA: 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

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

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.
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

7.1 AUTORES: Claudinei Jurandir Figueira e Marcos Roberto Franchi..

7.2 REVISORES: Claudinei Jurandir Figueira e Marcos Roberto Franchi.

8. REFERÊNCIAS

1. Gyongyi M Nadasdy et al.
2. Human pathology, 36(11), 1178-1185 (2005-11-02)
3. 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.
4. 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.

9. ANEXOS: N/A

10.TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO E APROVAÇÃO DE DOCUMENTO

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

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO ELETRÔNICA E APROVAÇÃO DE DOCUMENTO

1. IDENTIFICAÇÃO DO DOCUMENTO

1.1.Título: POP NAPAT LAB IMF 001 – TÉCNICA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

1.2. Área Responsável: NÚCLEO DE ANATOMIA PATOLOGIA – NAPAT

1.3. Data da Elaboração: 24/02/2022 – Total de páginas: 06 Data da Versão: 07/03/2025
Número da Versão: 01

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 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA**

Também autorizo a exposição do meu nome completo.

Data: 18/03/2025	Supervisor: Marcos Roberto Franchi Assinatura:
Data: 25/03/25	Nome Completo Diretor: Dr. Marcelo Padovani de Toledo Morais Assinatura: