

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 003
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/4
Assunto: Reações de Imunohistoquímica Recuperação de Antígenos com Trilogy™ - CELL MARQUE / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

*ÍNDICE

1. OBJETIVO
2. ABRANGÊNCIA
3. RESPONSABILIDADES
4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES
5. DEFINIÇÕES
6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS
7. FLUXOGRAMAS
8. ANEXOS
9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Edição	Alteração
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 013A; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

Elaborado por: Suely Aparecida Pinheiro Palomino Bióloga	27/07/2015	Aprovado por: Prof.Dra Maria Lourdes Higuchi Pesquisadora	15/03/21
---	------------	--	----------

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 003
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/4
Assunto: Reações de Imunohistoquímica Recuperação de Antígenos com Trilogy™ - CELL MARQUE / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos parafinados, utilizando para a recuperação do anticorpo o Trilogy™, sendo marcados em seguida com o Kit HiDef Detection™ HRP Polymer System, da marca CELL MARQUE ou o Kit Picture Max Polymer Detection System da Marca Invitrogen

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem, as Reações de Imunoperoxidase, utilizando o Trilogy™, a recuperação do anticorpo.

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 Trilogy™ é um produto que combina as três etapas de pré-tratamento: desparafinização, reidratação e desmascaramento, recuperando antígenos em material biológico, que foram fixados em formol e embebidos em parafina, para a realização da imunohistoquímica. Utilizando o Kit HiDef Detection™ HRP Polymer System, da marca CELL MARQUE ou o Kit Picture Max Polymer Detection System da Marca Invitrogen

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- 6.1 **Preparação da Lâmina com material biológico.**
 - 6.1.1 Material biológico
 - 6.1.1.1 Para cada anticorpo que será marcado pela reação de Imunoperoxidase, terá uma lâmina com amostra do material biológico, fixado em formol, processado e parafinado e uma lâmina com o material biológico positivo, para o anticorpo específico, que será pesquisado

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 003
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/4
Assunto: Reações de Imunohistoquímica Recuperação de Antígenos com Trilogy™ - CELL MARQUE / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

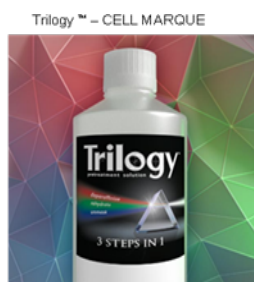
6.1.2 Desparafinação das Lâminas

6.1.2.1 Seguir o POP TEC 001

6.1.3 Recuperação do Antígeno

6.1.3.1 Após a desparafinação, recuperar o antígeno usando o Trilogy™, guardado na geladeira (7/9) , Catalogo-920P-07 – Cell Marque (California-USA)

Fig. 01



6.1.3.2 Diluir o Trilogy™ 1:100 em água de injeção

6.1.3.3 Mergulhar as lâminas desparafinadas na solução e colocar na panela Pascal (2 min. 121°C.

6.1.3.4 Colocar também ,cubas com água da torneira suficientes para o mesmo número de lâminas, dentro da panela Pascal

6.1.3.5 Terminando o programa, da panela Pascal.Transferir, as lâminas para as cubas ,que estavam junto na panela com água quente da torneira , agitar e manter 5 min. Em repouso a temperatura. Ambiente.

6.1.3.6 Em seguida enxaguar em água corrente

6.1.3.7 O Trilogy™, usado para um outro frasco, podendo ser reutilizado 4 vezes

6.1.4 Bloqueio da Peroxidase endógena do tecido:

6.1.4.1 As lâminas após a Recuperação, são mergulhadas em peróxido de hidrogênio 6% (água oxigenada 20v) diluída em água injetável, em dois banhos de 8 minutos.

6.1.4.2 Lavar bem em água corrente (leve).

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 003
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/4
Assunto: Reações de Imunohistoquímica Recuperação de Antígenos com Trilogy™ - CELL MARQUE / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.4.3 Secar as lâminas suavemente e circundar os cortes com Pap-pen. Mergulhar as lâminas em tampão PBS pH 7.4+ Tween 0,1% (POP 9)
- 6.1.5 Bloqueio de Proteínas Inespecíficas do tecido:
 - 6.1.5.1 Secar ao redor do Pap-pen, pingar CAS Block (Invitrogen) sobre os cortes
 - 6.1.5.2 Incubar em câmara úmida durante 10 minutos à 26°C± 5°C
- 6.1.6 Anticorpo primário:
 - 6.1.6.1 Escorrer o CAS Block, secar em volta dos cortes e pingar o Anticorpo Primário, diluído com o Antibody Diluent Solution (Invitrogen), de acordo com a padronização prévia realizada.
 - 6.1.6.2 Incubar as lâminas por 1h em câmara úmida à 26°C± 5°C
 - 6.1.6.3 Lavar em PBS+ Tween 0,1%(POP 9)
- 6.1.7 Detecção do Antígeno
 - 6.1.7.1 Continuar a reação, marcando os antígenos com o Kit de HiDef Detection™ HRP Polymer System, da marca CELL MARQUE ou o Kit Picture Max Polymer Detection System da Marca Invitrogen

7. FLUXOGRAMAS

Não aplicável

8. ANEXOS

- 8.1 Não aplicável.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 9.1 Trilogy™ - Cell Marque Data Sheet