

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 018A
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/6
Assunto: Pesquisa 14/01 . CNPQ Universal Imunofluorescência		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 039 com data de vigência de 27/07/2015.</i>

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

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 018A
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/6
Assunto: Pesquisa 14/01 . CNPQ Universal Imunofluorescência		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de materiais biológicos em pacientes com Ateroscleróticos ,para a realização da Pesquisa 14/01, CNPQ Universal.
- Pesquisa realizada com poucos casos, sendo aumentado o números de pacientes, dando sequência na Tese da Camila Rodrigues Moreno

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que estão envolvidos na Pesquisa 14/01, CNPQ Universal.

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável.

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A P14/01 é uma pesquisa realizada em pacientes Ateroscleróticos, Com a finalidade de caracterizar marcadores presentes no soro, que possam identificar a presença de placa instável, nos no soro destes pacientes. Serão pesquisados os antígenos de *Micoplasma pneumoniae*, LDLox, Colagenase de Arqueia (anti- archaemetzincin-1 - AMZ1 e MMP-9. A quantificação, destes antígenos, será realizada através da Microscopia Eletrônica de Transmissão
- Os soros serão fornecidos pelo laboratório do Prof Lotufo e transportados, em gelo seco, armazenados em vial de congelamento, com aproximadamente 400µl cada .
- O material será registrado no computador 12 (Marcia) – <Pasta compartilhada><Pasta: Registro Patologia Cardíaca><Registro Geral (Excell) ><aba: PI 14 01 soros HU-CNPq> o número foi dado seguindo a sequencia do registro.

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

- 6.1 **Material**

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 018A
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/6
Assunto: Pesquisa 14/01 . CNPQ Universal Imunofluorescência		Vigência: 08/03/2021

6.1.1 A separação das micropartículas do soro em pellet e sobrenadante seguiu o protocolo descrito no POP TEC 20.

6.1.2 Diluir os anticorpos primários em PBS p.H 7,3, seguindo a **Tabela 1**

Anticorpo	Código	Diluição da solução mãe	origem
Micoplasma pneumoniae	APU	1/100	Rabbit
LDL oxi	AOQ2	1/10	Mouse
MMP9	AMP1	1/100	Rabbit
Clamidia pneumoniae	AQB	1/20	Mouse

:

6.1.3 Preparar 8 tubos pipetando em cada um **Tabela 2** .

tubo	material		Anticorpo diluído em PBS (Tabela 1)			
			Anticorpo	Código	origem	Quantidade
1	pellet	10 µl	Micoplasma pneumoniae	APU [1/10.000]	Rabbit	0,1µL
2			LDL oxi	AOQ2 [1/100]	Mouse	1 □l
3			MMP9	AMP1 [1/10.000]	Rabbit	0,1µL
4			Clamidia pneumoniae	AQB [1/80]	Mouse	2,5µl

5	sobrenadante	10 µl	Micoplasma pneumoniae	APU [1/10.000]	Rabbit	0,1
6			LDL oxi	AOQ2 [1/100]	Mouse	1 □l
7			MMP9	AMP1 [1/10.000]	Rabbit	0,1µL
8			Clamidia pneumoniae	AQB [1/80]	Mouse	2,5µl

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 018A
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/6
Assunto: Pesquisa 14/01 . CNPQ Universal Imunofluorescência		Vigência: 08/03/2021

6.1.4 Incubar os 8 tubos por 1 hora, na estufa de incubação da Imuno a 24°C - Temperatura ambiente controlada

6.1.5 Diluir os anticorpos secundários 1/40 em PBS p H 7,3; solução mãe **Tabela 3**

Anticorpo	origem	Anticorpo diluído 1/40 pipetar	tubos	Pellet/ sobrenadante	Diluição final
Alexa flúor	Anti mouse	1 µl	2-4-6-8	400 µl	1/400
Alexa flúor	Anti rabbit	1 µl	1-3-5-7	400 µl	1/400

6.1.6 Incubar os 8 tubos por 1 hora, na estufa de incubação da Imuno a 24°C - Temperatura ambiente controlada. Pipetar mais ou menos 10µL dos tubos em 8 lâminas numeradas e fotografar no microscópio de fluorescência EVOS FL IMAGING SYSTEM

6.2 Equipamento

Microscópio Fluorescência N° 46
MOD.: EVOS AMG VOLT.:110V
MARCA:Advanced Mycroscopy Group
N° SERIE:S/N PATR.:USP 00517932
Sala 42

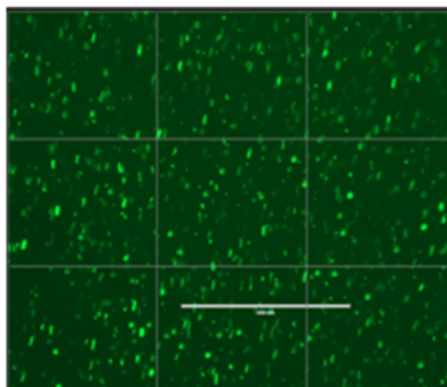


- 01- Tomada de Entrada de Energia
- 02- Interruptor de Comando(Liga/Desliga)
- 03- Entrada de USB
- 04- Puxadores de Posicionamento
- 05- Botão fase eixo X
- 06- Freio fase eixo X
- 07- Botão fase eixoY
- 08- Freio fase eixo Y
- 09- Botão focalização
- 10- Roda de Seleção de Objetivas
- 11- Alavanca de Seleção de cubo de luz
- 12- Seletor Anel de Fase
- 13- Condensador
- 14- Monitor

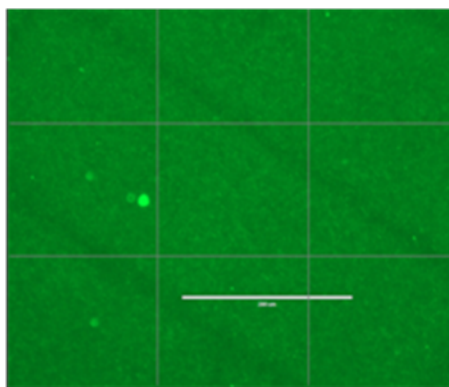
	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 018A
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 5/6
Assunto: Pesquisa 14/01 . CNPQ Universal Imunofluorescência		Vigência: 08/03/2021

6.2.1 Fotos tiradas, após a observação e escolhidas no **14-Monitor**

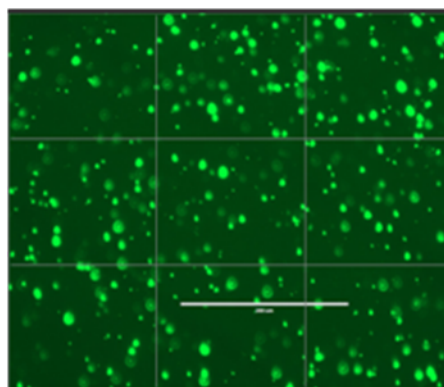
Micoplasma x20 no sobrenadante



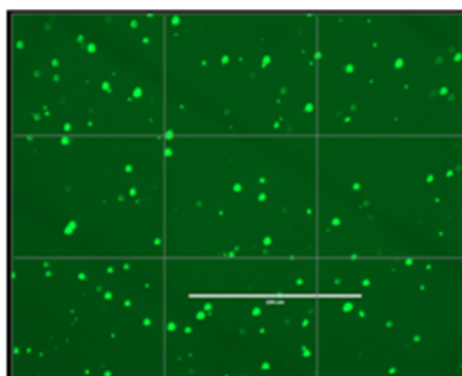
LDL x20 no sobrenadante



MMP9 x20 no sobrenadante



Clamidia pneumoniae x20 no sobrenadante



6.3 **Limpeza**

6.3.1 O local, deverá ser limpo antes e após o uso com gazes embebidas com Álcool 70°C , descartar o material usado. deixando limpo e organizado

6.4 **EPI:** Luvas nitrílicas, avental.**EPC:** fluxo laminar e Estação de trabalho

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 018A
		Edição: 05
Área: : Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 6/6
Assunto: Pesquisa 14/01 . CNPQ Universal Imunofluorescência		Vigência: 08/03/2021

7. FLUXOGRAMAS

7.1 .Não aplicável

.

8. ANEXOS

8.1 Não aplicável.

9. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 9.1 Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas, Antonio Haddad et al, 1998
- 9.2 Manual sobre Técnicas Básicas em Microscopia Eletrônica, Antonio Haddad et al, 1989