

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 021
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/4
Assunto: Microscopia Eletrônica Inclusão Rápida/Tecido/ 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 035; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

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

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 021
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/4
Assunto: Microscopia Eletrônica Inclusão Rápida/Tecido/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

1. OBJETIVO

- 1.1 Estabelecer normas para o preparo de Soluções, Tampões, Fixadores e Corantes, utilizados na Técnica de Inclusão rápida de material histológico, analisados pelo Microscópio Eletrônico.

2. ABRANGÊNCIA

- 2.1 Todos os colaboradores, alunos e estagiário.

3. RESPONSABILIDADES

- 3.1 Todos os profissionais que realizarem a Técnica de Inclusão rápida para a Microscopia Eletrônica

4. DOCUMENTOS COMPLEMENTARES

- 4.1 Não aplicável

5. DEFINIÇÕES

- 5.1 A Técnica de Inclusão Rápida de Material Biológico, para a análise pelo Microscópio Eletrônico, necessita de Soluções, Tampões, Fixadores e Corantes, que serão preparados pelos profissionais do Laboratório..

6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

6.1 Preparo de Reagentes

- 6.1.1 Tampões, Fixadores e Corantes utilizados nesta Técnica, estão no POPs 019 e 020

6.2 Fixação das amostras:

- 6.2.1 O tecido será cortado com o auxílio de lâminas de inox em cima de papel alumínio estéril (quando necessário, cortar de tal maneira que se respeite o limite das camadas do fragmento), adicionar 1000µl de Glutaraldeído 3% e incubar na geladeira (Nº6) por 3 horas a 4°C.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 021
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/4
Assunto: Microscopia Eletrônica Inclusão Rápida/Tecido/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.2.2 A seguir, adicionar 500µl de Hexaferricianeto 2% + 500µl de Ósmio reduzido 2. Incubar 2 horas a 4°C (geladeira nº6). Lavar o fragmento 3 vezes com 500µl de solução salina 0,9% sacarose.

6.2.3 Adicionar ao fragmento 500ul de Uranila 0,5%, 0,40M com Sacarose (incubar a 4°C por 16 horas na geladeira N°6). Lavar o fragmento 3 vezes com 500µl de solução salina 0,9% sacarose.

6.3 **Desidratação**

6.3.1 Com **Etanol 70%**: adicionar ao fragmento 500µl de Etanol 70% e incubar por 10minutos a TA. Repetir este procedimento 3 vezes.

6.3.2 Com **Dimetoxipropano**: adicionar ao fragmento 500µl de 2,2-Dimetoxipropano acidificado e incubar por 5 minutos a TA.

6.4 **Fixação**

6.4.1 Em **Acetona**: adicionar ao fragmento 500µl de Acetona (parte superior do Sulfato de Cobre 4% em Acetona), e incubar por 2 minutos a TA.

6.4.2 Preparar em um tubo a parte a mistura de Acetona com resina Polybed 812/Araldite F (1:1). Adicionar 500ul da mistura ao fragmento e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente.

6.5 **Etiquetas**

6.5.1 Em papel manteiga identificando os casos com caneta SAKURA (a base de Acetona). Usar sempre esta caneta para identificar as amostras, pois esta caneta não apaga a identificação, após a adição da resina. Colocar a identificação virada para baixo nos moldes de silicone e completar com resina Polibpolybed 812/Araldite F. Atenção para formação de bolhas nos moldes, caso isso ocorra, retire todas as bolhas com o auxílio de uma agulha, pois se sobrar bolhas no bloco ele pode quebrar quando for colocado no trimador

6.5.2 Retirar o fragmento com o auxílio de uma agulha e colocar nos moldes de silicone (respeitar posição quando TIRAR)

6.6 **Polimerização:**

6.6.1 Em seguida as cápsulas serão incubadas na estufa (21) a 60°C por 24 horas.

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL	Número: POP TEC 021
		Edição: 05
Área: Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/4
Assunto: Microscopia Eletrônica Inclusão Rápida/Tecido/ Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

6.7 **Limpeza :**

- 6.7.1 O local, deverá ser limpo antes e após o uso com gazes embebidas com Álcool 70°C , descartar o material usado

6.8 **EPIs**

- 6.8.1 Luvas Nitrílicas e Avental.

7. **FLUXOGRAMAS**

- 7.1 Não aplicável

8. **ANEXOS**

- 8.1 Não aplicável

9. **REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA**

- 9.1 O protocolo será feito segundo descrito por Duarte, MIS et al – A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. Ultrastructural Pathology, 16:475-482, 1982, com modificações.