

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 022</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 1/4
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica / Soro / Inclusão Rápida / 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

<i>Edição</i>	<i>Alteração</i>
01	Emissão inicial do documento em 27/07/2015. <i>Nota: inicialmente o conteúdo deste documento estava disponível no ONADOCS , POP 036; com data de vigência de 27/07/2015.</i>

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

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 022</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 2/4
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica / Soro / Inclusão Rápida / 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 Soro, 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 Soro, para a análise pelo Microscópio Eletrônico, necessita de Soluções, Tampões, Fixadores e Corantes, que serão preparados pelos profissionais do Laboratório.

## 6. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

### 6.1.1 Preparo de Reagentes

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

### 6.1.2 Fixação das amostras

- 6.1.2.1 Volume de amostra: 400 µl de amostra + 1000µl de glutaraldeído 3%.  
Separar em dois microtubos de 1500µl (700µl em cada microtubo). Incubar na geladeira (n°6) por 3 horas a 4°C.
- 6.1.2.2 A seguir, adicionar 350µl de Hexaferricianeto 2% + 350µl de Ósmio (Ósmio reduzido), incubar 2 horas a 4°C (Geladeira n°6).
- 6.1.2.3 Centrifugar, centrifuga refrigerada (n°36) no programa 2 (12000 rpm, 20 minutos a 12 °C), descartar o sobrenadante, usar somente o pellet.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 022</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 3/4
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica / Soro /Inclusão Rápida / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

- 6.1.2.4 Lavar o pellet, ressuspendendo com 500µl de Solução Salina 0,9% Sacarose.  
Centrifugar, centrifuga refrigerada (n°36) no programa 2, descartar o sobrenadante.
- 6.1.2.5 Adicionar ao pellet 500ul de Uranila 0,5%, 0,40M com Sacarose (incubar a 4°C por 16 horas na Geladeira n°6).  
Centrifugar, centrifuga refrigerada (n°36) no programa 2, descartar o sobrenadante.
- 6.1.2.6 Lavar o pellet, ressuspendendo com 500µl de solução salina 0,9% sacarose.  
Centrifugar, centrifuga refrigerada (n°36) no programa 2, descartar o sobrenadante.
- 6.1.3 **Desidratação**
- 6.1.3.1 Usando Etanol 70%:
- 6.1.3.1.2 Adicionar ao pellet 500µl de Etanol 70%, ressuspende o pellet e incubar por 10 minutos a Temperatura Ambiente.  
Centrifugar, centrifuga refrigerada (n°36) no programa 2, descartar o sobrenadante.
- 6.1.3.2 Usando Dimetoxipropano
- 6.1.3.2.1 Adicionar ao pellet 500µl de 2,2-Dimetoxipropano acidificado ,ressuspende o pellet e incubar por 5 minutos a Temperatura Ambiente.  
Centrifugar, centrifuga refrigerada (n°36) no programa 2, descartar o sobrenadante.
- 6.1.4 **Fixação em Acetona:**
- 6.1.4.1 Adicionar ao pellet 500µl de Acetona (parte superior do Sulfato de Cobre 4% em Acetona), ressuspende o pellet e incubar por 2 minutos a Temperatura Ambiente.  
Centrifugar, centrifuga refrigerada (n°36) no programa 2, descartar o sobrenadante.
- 6.1.4.2 Preparar em um tubo a parte a mistura de Acetona com Resina Polybed 812 com Araldite F (1:1). Adicionar 500ul da mistura sobre o pellet e ressuspende-lo; incubar por 30 minutos a Temperatura Ambiente.
- 6.1.4.3 Transferir todo o material para a capsula de inclusão identificando as devidamente e centrifugar a 2000 rpm por 10 minutos (centrifuga não refrigerada n°60).
- 6.1.4.4 Remover o sobrenadante com micropipeta e adicionar resina Araldite/Epon ate completar a capsula.
- 6.1.5 **Polimerização:**
- 6.1.5.1 Em seguida as capsulas serão incubadas na estufa (n°21) a 60°C por 24 horas.

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL</b>	Número: <b>POP TEC 022</b>
		Edição: 05
<b>Área:</b> Laboratório de Patologia Cardíaca		Página: 4/4
<b>Assunto:</b> Microscopia Eletrônica / Soro / Inclusão Rápida / Limpeza do Local		Vigência: 08/03/2021

## 6.2 LIMPEZA

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

## 6.3 EPIs

6.3.1 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.