

Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™

Rede Nacional de Laboratórios de CD4+/CD8+
Ministério da Saúde



Depois de completar esse treinamento você será capaz de:

- Solucionar problemas que possam ocorrer durante a rotina laboratorial.
- Realizar o controle de qualidade do instrumento utilizando o software BD FACSComp™.
- Gravar e analisar arquivos multicolor utilizando o software BD Multiset™.
- Criar uma lista de trabalho.
- Criar painéis.

BD Biosciences
Rua Alexandre Dumas, 1976
04717-004, Brasil
0800 771 7157
suporte.cientifico@bd.com
bdbiosciences.com/br



Russo, Ricardo Toledo
Kuribayashi, Juliana Sayuri
da Silva, Vanessa Santos
Cavalcanti, Clara Maciel
Barros, Helena Cristina

Treinamento em quantificação de linfócitos T CD4+/CD8+ por citometria de fluxo – plataforma BD FACSCalibur 4 cores. -- São Paulo, 2010.
230 f.

1. citometria de fluxo. 2. linfócitos T. 3. CD4.
4. CD8. 5. HIV. 6. AIDS.



Ricardi, Renata
Russo, Ricardo Toledo
Kuribayashi, Juliana Sayuri
da Silva, Vanessa Santos
Cavalcanti, Clara Maciel
Barros, Helena Cristina

Treinamento em quantificação de linfócitos T CD4+/CD8+ por citometria de fluxo – plataforma BD FACSCalibur 4 cores. -- São Paulo, 2012.
169 f.

1. citometria de fluxo. 2. linfócitos T. 3. CD4.
4. CD8. 5. HIV. 6. AIDS.



Sant Anna, Maira Macedo
Ricardi, Renata
Russo, Ricardo Toledo
Kuribayashi, Juliana Sayuri
da Silva, Vanessa Santos
Cavalcanti, Clara Maciel
Barros, Helena Cristina

Treinamento em quantificação de linfócitos T CD4+/CD8+ por citometria de fluxo – Nível Avançado - Plataforma BD FACSCalibur 4 cores. -- São Paulo, 2013.
187 f.

1. citometria de fluxo. 2. linfócitos T. 3. CD4.
4. CD8. 5. HIV. 6. AIDS.



Sene, Reginaldo Vieira
Calmon, Flávia
Sant Anna, Máira Macedo
Ricardi, Renata
Russo, Ricardo Toledo
Kuribayashi, Juliana Sayuri
da Silva, Vanessa Santos
Cavalcanti, Clara Maciel
Barros, Helena Cristina

Treinamento em quantificação de linfócitos T CD4+/CD8+ por citometria de fluxo – Nível Avançado - Plataforma BD FACSCalibur 4 cores. -- São Paulo, 2014.
242 f.

1. citometria de fluxo. 2. linfócitos T. 3. CD4.
4. CD8. 5. HIV. 6. AIDS.



Reis, Edione Cristina
Sene, Reginaldo Vieira
Calmon, Flávia
Sant Anna, Maira Macedo
Ricardi, Renata
Russo, Ricardo Toledo
Kuribayashi, Juliana Sayuri
da Silva, Vanessa Santos
Cavalcanti, Clara Maciel
Barros, Helena Cristina

Treinamento em quantificação de linfócitos T CD4+/CD8+ por citometria de fluxo – Nível Avançado - Plataforma BD FACSCalibur 4 cores. -- São Paulo, 2021.
234 f.

1. citometria de fluxo. 2. linfócitos T. 3. CD4.
4. CD8. 5. HIV. 6. AIDS.



GLOSSÁRIO

- **BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC** – Partículas (*beads* – esferas de poliestireno) marcadas ou não-marcadas com fluorocromos usadas para verificar a linearidade do BD FACSCalibur™. Ajusta as voltagens e os valores de compensação para leitura de amostras e testa a sensibilidade dos detectores.
- **Câmara de fluxo:** Local do fluxo de amostra onde o laser incide na célula ou partícula de interesse.
- **Compensação:** procedimento realizado para eliminar a sobreposição de espectros de emissão dos fluorocromos, permitindo que cada detector identifique somente uma fluorescência específica.
- **Detectores:** responsáveis por converter o sinal luminoso em pulsos elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa ou fluorescente captada pelo detector. São divididos em:
 - **Fotodiodo-** menos sensível precisa de intensidade de luz maior para gerar sinal elétrico. Detector de tamanho – FSC.
 - **Fotomultiplicador (PMTs)**– mais sensível e desta forma precisa de intensidade de luz menor para gerar sinal elétrico. Detectores de Fluorescências e granulidade/complexidade interna. No BD FACSCalibur™, temos os seguintes PMTs: FL1 (identifica FITC), FL2 (identifica PE), FL3 (identifica PerCP), FL4 (identifica APC) e SSC (identifica granulidade/complexidade interna).
- **Dot plot** – Gráfico de pontos, que representam as populações celulares no laboratory report emitido para cada amostra durante a rotina.
- **BD FACSComp™:** Software utilizado para realizar o ajuste das voltagens dos PMTs, ajuste da compensação e teste de sensibilidade do equipamento através das partículas BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC.



- **BD FACSComp™ report:** Laudo emitido pelo BD FACSComp™ após os ajustes de voltagens dos PMTs, de compensação e teste de sensibilidade do equipamento realizados pelo BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC. Constatam os valores de voltagens definidos para cada um dos PMTs, valores de compensação e dos testes de sensibilidade, assim como os gráficos que permitem a visualização da performance do equipamento.
- **Filtro de BD FACSFlow™:** responsável por filtrar a solução BD FACSFlow™ antes de sua entrada na célula de fluxo. Isto reduz a quantidade de debris na solução.
- **Fluorocromos (FITC, PE, PerCP, APC)** – Partículas associadas aos anticorpos que emitem fluorescência ao entrarem em contato com o laser. No BD FACSCalibur™ da Rede do Ministério, usamos FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), PerCP (peridinin chlorophyl protein) e APC (aloficocianina).
- **FL (1,2,3,4)** – Medidas provenientes de cada um dos detectores (parâmetros). FL1 representa o parâmetro obtido do detector que lê FITC; FL2 representa o parâmetro obtido do detector que lê PE; FL3 representa o parâmetro obtido do detector que lê PerCP e FL4 representa o parâmetro obtido do detector que lê APC.
- **FSC** – Detector do tipo fotodiodo (menos sensível que PMTs) que identifica tamanho das células ou partículas.
- **Gate-** Seleção feita em cima de populações, em um gráfico, para separar, identificar ou selecionar populações.
- **Laboratory Report** – Gráfico emitido para cada amostra durante a rotina. É aquele report que contém os gráficos (dot plots).
- **BD Multiset™** – Software clínico utilizado no BD FACSCalibur™. É o programa utilizado nos BD FACSCalibur™ da Rede do Ministério para leitura de amostras da rotina.



- **BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC**– Reagente utilizado na rotina. Contém os anticorpos monoclonais necessários para identificação das populações celulares importantes em exames CD4/CD8: anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 e anti-CD45.
- **Otimização** – processo que ajusta o aparelho para um melhor desempenho para aquisição de amostras específicas. A compensação é um dos passos da otimização.
- **Physician Report** – Laudo emitido para cada amostra durante a rotina. É aquele report que contém os valores percentuais e absolutos de cada população celular.
- **Prime**- Tecla do BD FACSCalibur™ que permite a eliminação de bolhas através do esvaziamento e posterior preenchimento da câmara de fluxo, com solução BD FACSFlow™.
- **Probe** – Peça do BD FACSCalibur™ onde colocamos os tubos de amostra para leitura. Também é chamado de tubo de injeção de amostra ou SIP.
- **Solução de Lise** – Reagente preparado a partir de uma solução 10x concentrada (BD FACS™ Lysing Solution) e usado durante a preparação.
- **SSC** - Detector do tipo fotomultiplicador (PMT) que identifica granulosidade ou complexidade das células ou partículas.
- **Standby**: Interrompe o fluxo de solução BD FACSFlow™ e diminui a potência do laser para prolongar seu tempo de vida.



- **BD Trucount™ Control Beads** – Nome dado ao controle que fazemos na rotina para verificarmos pipetagem e as *beads* dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes. São partículas (*beads*) em diferentes quantidades (low, medium e high) que são adicionadas ao final da preparação de três determinadas amostras para realização do referido controle.
- **BD Trucount™ Absolute Count Tubes** - Tubos usados para preparação de amostras da rotina que contêm *beads* de referência no fundo para realização da contagem absoluta.



SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (Aids)

A aids é uma síndrome recente (sua descrição se deu em 1981 pelo CDC-EUA). O aumento de notificações de pacientes com déficit grave de linfócitos T *helper* despertou as autoridades de saúde para o problema. Constatou-se que estes pacientes eram muito suscetíveis a infecções oportunistas e a tumores como o sarcoma de Kaposi. Posteriormente, após grande trabalho de pesquisa, demonstrou-se que o vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* – HIV) era o agente causador da aids. *Nessa seção foram utilizadas as referências 1, 2, 3 e 4 descritas no capítulo final desse documento.*

CICLO DE VIDA DO HIV

Como todos os vírus, o HIV é um parasita obrigatório, isto é, o vírus só consegue se reproduzir utilizando a maquinaria da célula hospedeira. O HIV tem seu material genético na forma de ácido ribonucléico (RNA) e, por isso, faz parte da classe dos retrovírus. O RNA está presente em duas fitas simples dentro do capsídeo ou *core* protéico. O envelope é a membrana biológica que envolve o core protéico ou capsídeo. No envelope se encontram as glicoproteínas gp120 e gp41. A sigla “gp” se refere ao termo glicoproteína e os números se referem à massa molecular, expressa em quilodaltons. A gp120 e a gp41 interagem com os receptores de superfície da célula hospedeira, permitindo a fusão do vírus e a injeção de seu material genético. Dentro do core protéico ou capsídeo, encontram-se, além do RNA, três enzimas essenciais para a replicação viral: a **integrase**, a **protease** e a **transcriptase reversa**.

Como dissemos, os vírus necessitam de uma célula hospedeira para se reproduzir. No caso do HIV, esta célula é o linfócito T *helper* ou auxiliar. O primeiro passo do ciclo reprodutivo do HIV é a sua fusão com a membrana do linfócito T *helper*. A ligação entre o vírus e o linfócito T auxiliar se dá pela ligação da gp120 com a molécula CD4. Após a fusão, o HIV injeta seu RNA no citoplasma do linfócito T *helper*. É neste ponto que a **transcriptase reversa** age, produzindo uma dupla-fita (*double-strained*, em inglês) de DNA a partir do RNA viral. A transcriptase reversa é uma DNA polimerase dependente de RNA, isto é, é capaz de produzir um DNA complementar a partir de um RNA por meio de um processo conhecido como **transcrição reversa**. O que representa a reversão do dogma central da biologia molecular, que diz que o DNA dá origem ao RNA (transcrição) e este, por sua vez, dá origem às proteínas (tradução). Após a geração do DNA pela transcrição reversa, ocorre o processo conhecido como **integração**.



Pela ação da **integrase**, o DNA viral se integra ao genoma do linfócito T *helper*, formando o que se chama pró-vírus de DNA. O DNA viral integrado no genoma do linfócito T *helper* passa a ser transcrito para RNA, que, por sua vez é traduzido nas proteínas que serão parte do capsídeo e do envelope viral. A transcrição e a tradução referidas ocorrem por meio das enzimas da célula hospedeira. A **protease** cliva as proteínas do HIV recém-formadas para que estas se adaptem à conformação do vírus. Após a montagem dos novos vírus, ocorre o brotamento, que é a liberação dessas novas partículas virais para o ambiente extracelular. Os vírus liberados estão prontos para infectar outras células e repetir o ciclo reprodutivo. Para que se tenha idéia da rapidez dos eventos, do momento da fusão até a liberação das novas partículas virais passam-se apenas 24 horas. *Nessa seção foram utilizadas as referências 1 e 2, descritas no capítulo final desse documento.*

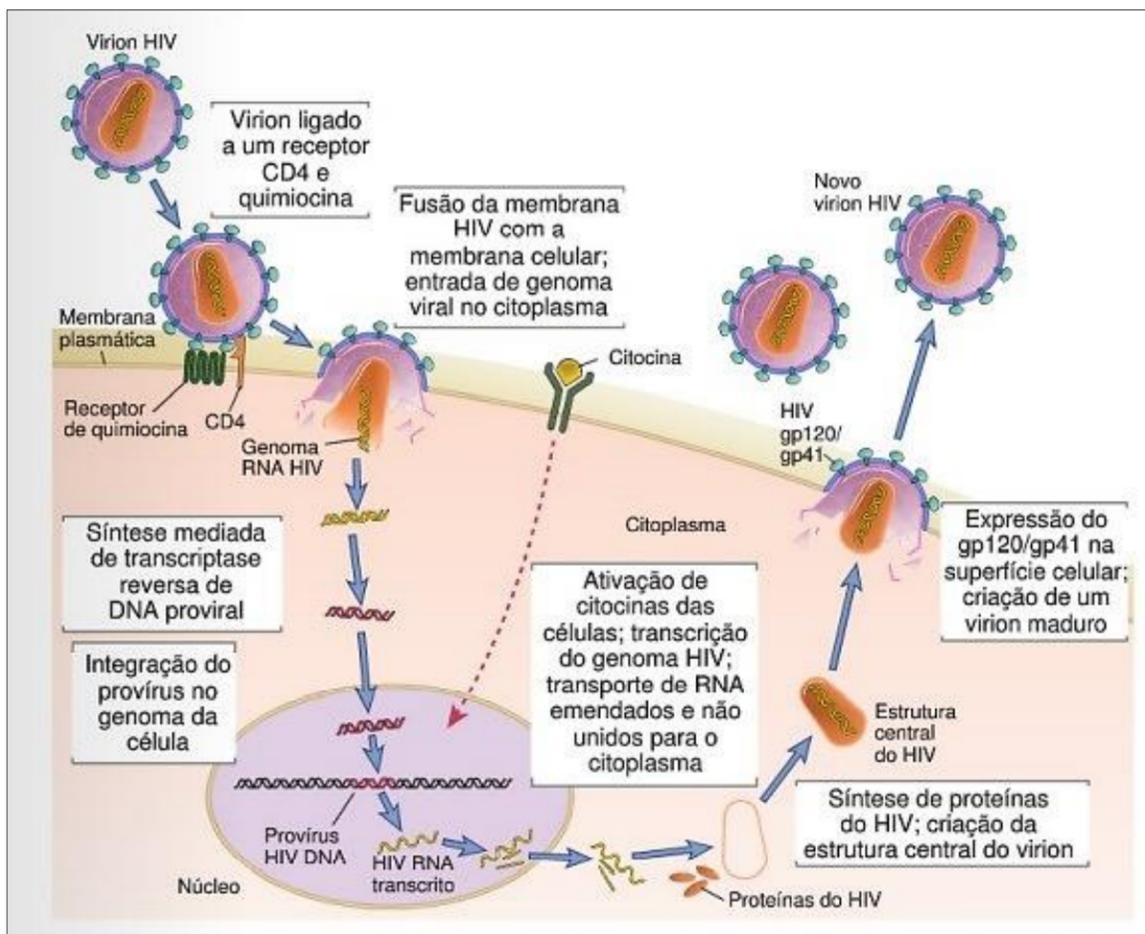


Figura 1: Ciclo de reprodução do vírus HIV. Fonte: Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 8ª ed. 2015



PATOGÊNESE

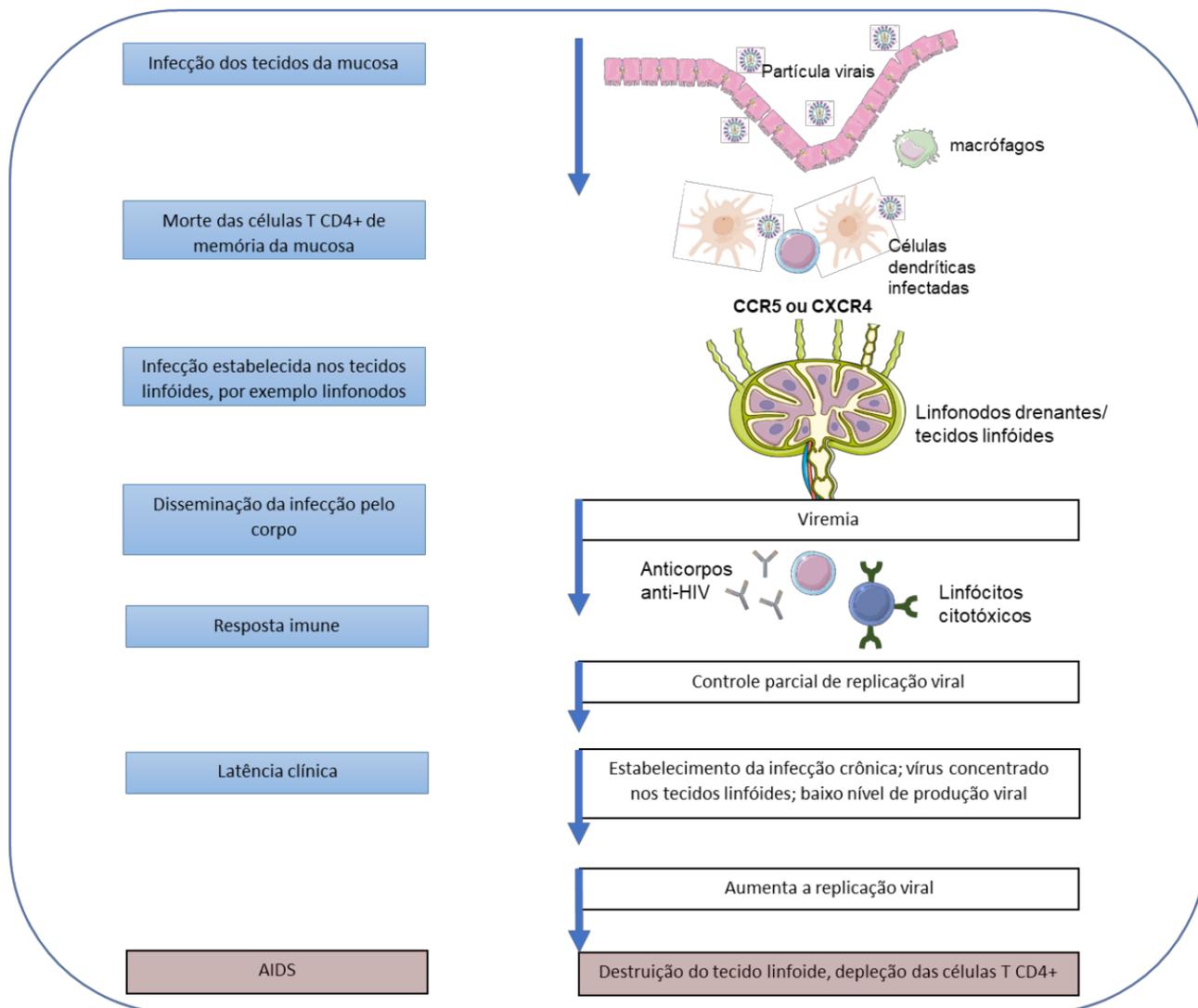


Figura 2: Trajetória da infecção. Fonte: Adaptado de Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 8ª ed. 2015. A ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.



A infecção pelo vírus gera uma diminuição do número de linfócitos T helper circulantes (células T CD4+). Isto ocorre porque estas células são depletadas. Até onde se sabe, os linfócitos T helper morrem por três razões:

- (1) as células hospedeiras podem ser lisadas pelo excesso de vírus em seu citoplasma;**
- (2) podem ficar excessivamente ativadas para responder contra a infecção e entrarem em processo de morte celular programada (apoptose);**
- (3) as células T citotóxicas podem matar os linfócitos T helper infectados por citotoxicidade.**

O fato de haver essa queda na contagem de linfócitos T CD4+ tem como consequência a desorientação do sistema imune, que se torna incapaz de responder adequadamente a infecções e tumores. A esse fenômeno dá-se o nome de imunodeficiência. Quando o paciente entra em estado de imunodeficiência, fica suscetível a uma série de tumores e outras infecções que normalmente não se estabeleceriam num paciente imunocompetente. Como tais infecções só têm sucesso quando há uma oportunidade (como a imunodeficiência, por exemplo), são chamadas de infecções oportunistas. Em geral, os pacientes com AIDS vêm a óbito por conta de complicações advindas de infecções oportunistas.

Na trajetória da infecção pelo HIV, inicialmente, há um aumento repentino da carga viral, que leva a uma queda brusca da contagem de linfócitos T CD4+. Esta fase é conhecida como **síndrome aguda**. Em seguida, com o início da resposta imune específica contra o vírus, a carga viral diminui, mas o vírus não é eliminado, permanecendo com um número de cópias mínimo por um longo período (meses a anos). Como consequência, a contagem de células T *helper* estabiliza, porém não recupera o nível inicial (pré-infecção), estabilizando-se pelo mesmo período da carga viral. Essa fase é conhecida como **latência clínica**. Depois de anos mantendo esse “equilíbrio”, a carga viral volta a aumentar e, por consequência, a contagem de células T *helper* volta a cair. Tal queda, porém, se dá a partir do baixo patamar que se estabilizou na fase de latência clínica, diminuindo de maneira mais sensível o número de células T CD4+. Quando este fenômeno ocorre, o paciente fica muito suscetível a infecções oportunistas e tumores - ou seja, imunodeficiente - e por isto dizemos que o sujeito “entrou em aids” (figura 3).



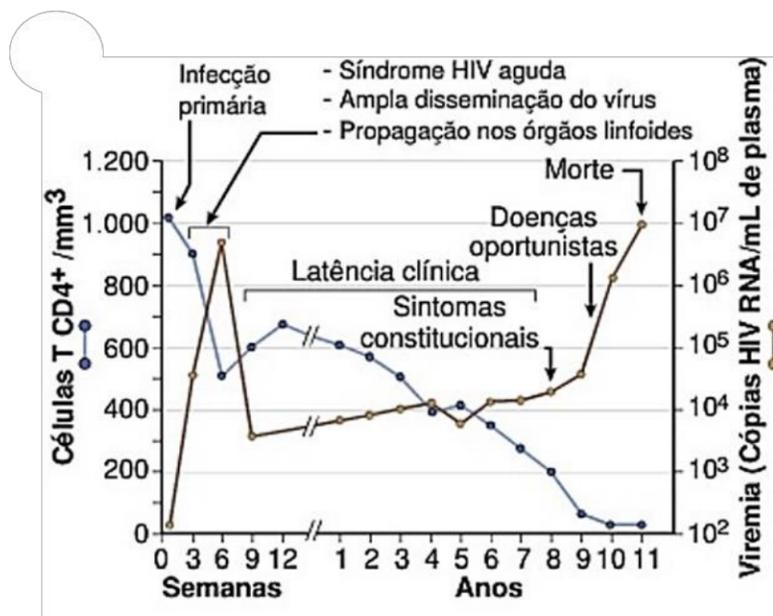


Figura 3: Contagem de LT CD4+ vs Viremia plasmática. Fonte: Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 8ª ed. 2015.

O tratamento da aids é feito pelo uso dos medicamentos que combatem retrovírus como o HIV, chamados de medicamentos antiretrovirais. Tais fármacos, porém, não eliminam o vírus, ou seja, não curam o paciente e produzem uma série de efeitos colaterais, que a longo prazo podem se tornar problemas graves para o paciente. É preciso ressaltar que o custo desses medicamentos, por serem de última geração e resultado de pesquisas caríssimas, é altíssimo. O uso extensivo dos antiretrovirais funciona como pressão seletiva para o estabelecimento de variantes virais resistentes aos tratamentos preconizados.

Existem diversos tipos de medicamentos antiretrovirais, cada um sendo capaz de impedir o sucesso de uma das fases do ciclo evolutivo do HIV.

Nessa seção foram utilizadas as referências 1, 2, 3, 4 e 5 descritas no capítulo final desse documento



QUANTIFICAÇÃO DE LTCD4+ E OBJETIVOS DO TRATAMENTO

A quantificação de LTCD4+ e o exame de carga viral são fundamentais no monitoramento da condição imunológica e virológica de pessoas vivendo com HIV. O monitoramento auxilia o clínico responsável na urgência de início da terapia antirretroviral, profilaxia para infecções oportunistas e modificação do tratamento. Com esse exame, é possível avaliar o grau de comprometimento do sistema imune e a recuperação da resposta imunológica com o tratamento adequado, além de definir o momento de interromper as eventuais profilaxias.

Segundo diretrizes do Ministério da Saúde, recomenda-se que a frequência de solicitação de exame de LTCD4+ para monitoramento laboratorial de pessoas vivendo com HIV, seja de acordo com a situação clínica, como indicado na tabela abaixo.

SITUAÇÃO CLÍNICA	CONTAGEM DE LT CD4+	FREQUÊNCIA DE SOLICITAÇÃO
<ul style="list-style-type: none">> Em uso de terapia antirretroviral; e> Assintomática; e> Com carga viral indetectável	CD4 < 350 cels/mm ³	A cada 6 meses
	CD4 > 350 cels/mm ³ em dois exames consecutivos, com pelo menos 6 meses de intervalo	Não Solicitar
<ul style="list-style-type: none">> Sem uso de terapia antirretroviral; ou> Evento Clínico; ou> Em falha virológica	Qualquer valor de LT CD4+	A cada 6 meses

Fonte: DIAHV/SVS/Ministério da Saúde, referência 6 descrita no final do capítulo.

É importante salientar que pacientes com a situação clínica estável, em terapia antirretroviral, com carga viral indetectável e contagem de LTCD4+ acima de 350 céls/mm³, a realização do exame de LTCD4+ não traz nenhum benefício ao monitoramento clínico-laboratorial.

Desde dezembro de 2013, o DCCI/SVS/ do Ministério da Saúde recomenda início imediato da terapia antirretroviral para todas as pessoas vivendo com HIV, independentemente do seu estágio clínico e/ou imunológico. A recomendação de início precoce da terapia antirretroviral considera, além dos claros benefícios relacionados à redução da morbimortalidade em pessoas que vivem com HIV, a diminuição da transmissão da infecção, o impacto na redução da tuberculose – a qual constitui principal causa infecciosa de óbitos no Brasil e no mundo – e a disponibilidade de opções terapêuticas mais cômodas e bem tolerada. *Nessa seção foi utilizada a referência 6 descrita no capítulo final desse documento.*



EXERCÍCIOS

1. Quais são as células que o HIV infecta?

2. Por que ocorre a diminuição da contagem de células T helper? Como?

3. Quais são, para o hospedeiro, as conseqüências da redução das contagens de células T helper?

4. Descreva o que ocorre com as contagens de linfócitos T, linfócitos T helper, linfócitos T citotóxicos e com a carga viral em cada fase da infecção pelo HIV.



5. Por que é importante acompanhar a contagem de linfócitos T helper em um paciente infectado pelo HIV?



PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma tecnologia avançada que permite a avaliação multiparamétrica de partículas e/ou células, à medida em que elas passam, em um meio líquido, por um feixe de luz (laser).

Em comparação com a microscopia, onde as células estão fixadas em uma lâmina e posteriormente coradas, na citometria, essas células se encontram em suspensão e são levadas através de um sistema pressurizado, a um local denominado célula de fluxo, onde ocorrerá a interceptação do laser na células e/ou partículas contidas na amostra. Dessa forma, no momento da “aquisição dos dados”, as células estão em movimento e por isso é possível contar milhares delas em um curto espaço de tempo.

A citometria teve início em meados de 1940, mas a metodologia ficou em maior evidência no final dos anos 80, com o surgimento da AIDS devido a necessidade de se monitorar a condição imunológica dos pacientes infectados. É possível, através da citometria de fluxo, ter acesso a proporção de células CD4/CD8 dos pacientes, informação fundamental para a decisão de início de tratamento com antirretroviral e ainda para o monitoramento da eficácia do tratamento.

É possível se analisar qualquer partícula ou célula com tamanho de 0,2 a 50 micrômetros por citometria de fluxo, ou seja, cromossomos, células sanguíneas, protozoários, algas, etc. Porém, antes de se iniciar uma análise, é necessário conhecer as configurações do instrumento a fim de ter certeza que o mesmo é apto a realizar a análise de escolha. Alguns instrumentos necessitam de modificações físicas para que possam identificar partículas com baixo tamanho.

A caracterização da célula/partícula acontece quando a mesma, em um fluxo contínuo, é interceptada por um feixe de laser. Este “encontro” do laser com a célula acontece na célula de fluxo. Quando a luz que incide na célula é dispersa em ângulos pequenos, ela atinge o fotodetector (fotodiodo) posicionado frontalmente ao laser, o FSC (*Forward Scatter*), gerando os valores referentes ao tamanho da célula. Quando a mesma luz é dispersa lateralmente, em ângulos maiores, ela atinge o fotodetector SSC (*Side Scatter*), gerando os valores referentes à granulosidade ou complexidade interna da célula. Portanto, os dois fotodetectores citados acima estão relacionados a dispersão de luz não à fluorescência.

Características celulares como forma, característica da membrana, tamanho, presença de grânulos e a complexidade interna dos diversos tipos celulares podem afetar a dispersão de luz.



Além das informações de tamanho e granulosidade também pode-se determinar o tipo celular de acordo com a expressão de marcadores de superfície e/ou intracelulares e essa metodologia é conhecida como Imunofenotipagem por citometria de fluxo.

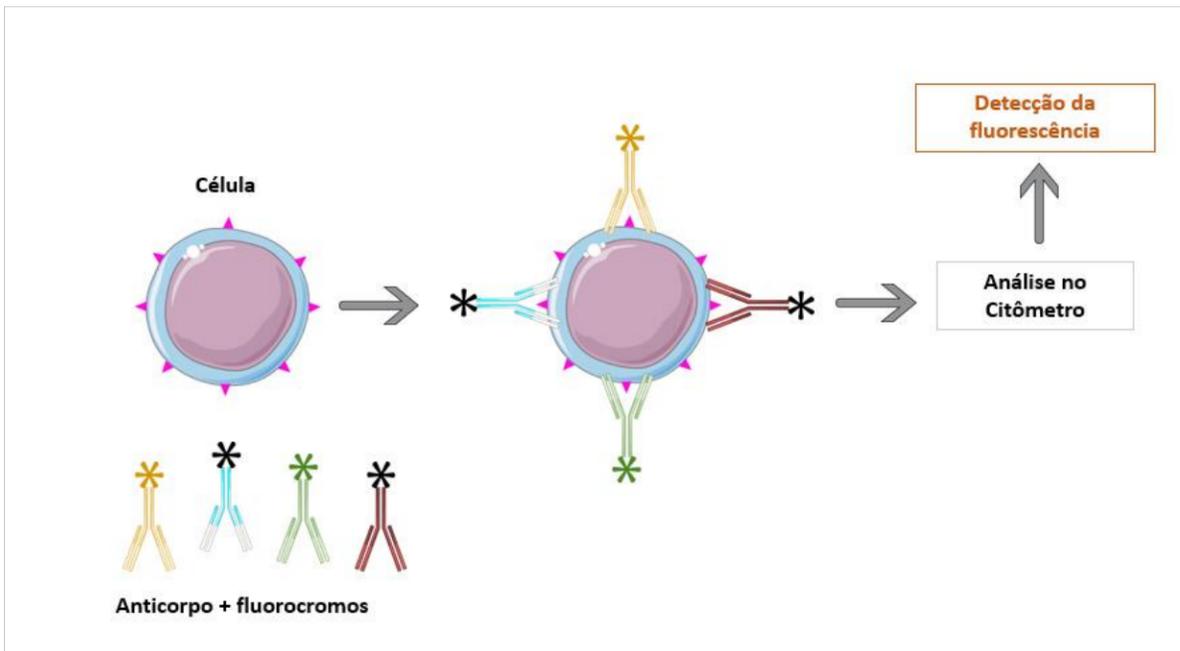


Figura 3: Imunofenotipagem. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

Na imunofenotipagem, anticorpos específicos conjugados à fluorocromos excitáveis por lasers são incubados com as células e se ligam às moléculas alvos.

O resultado da excitação do fluorocromo pelo laser é a emissão de fluorescência. O fenômeno da fluorescência consiste na absorção de energia por um elétron, passando do estado fundamental (S0) não excitado para o estado excitado (S1) onde ocorre a absorção de energia do laser pelo fluoróforo. Este elétron ao retornar ao estado fundamental é acompanhado pela liberação da energia absorvida por: vibração e dissipação de calor e emissão de fótons de comprimento de onda maior. Por exemplo, o fluorocromo FITC é excitado pelo laser azul de comprimento de onda de 488 nm e emite uma fluorescência de comprimento de onda de 520



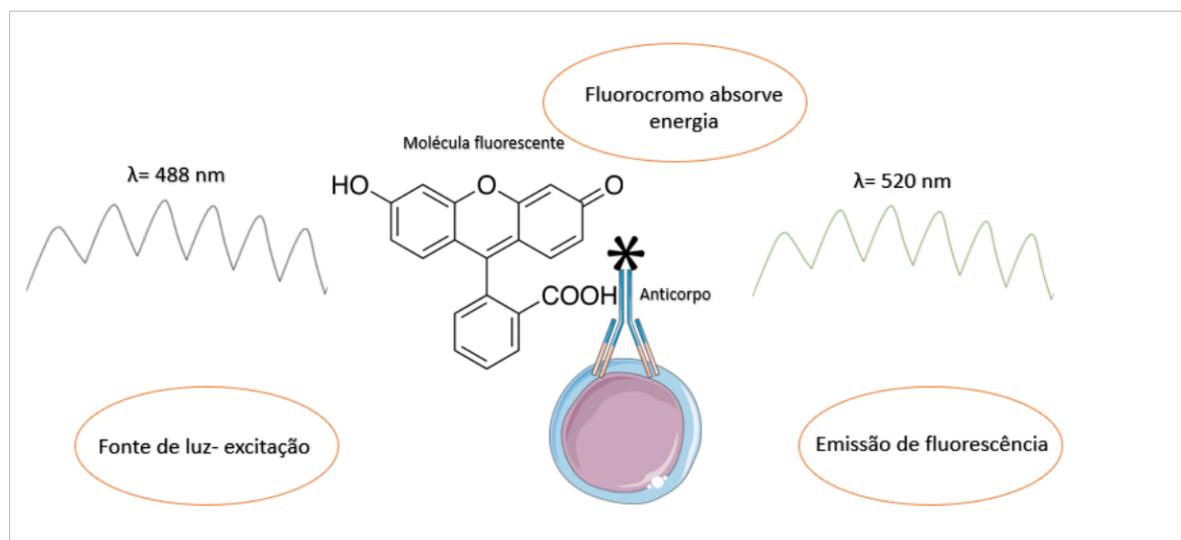


Figura 4: Emissão de fluorescência. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

Na rotina de quantificação de CD4/CD8 utilizamos um reagente denominado BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC cuja composição são anticorpos específicos para quatro marcadores celulares de superfície (CD3, CD8, CD45 e CD4). Cada um desses anticorpos está conjugado a um fluorocromo específico (FITC, PE, PerCP e APC) e a utilização de todos eles no mesmo tubo só é possível, porque os picos de emissão de fluorescência de cada um deles estão bem separados (como mostrado na figura abaixo), fazendo com que cada um seja detectado em um fotodetector de fluorescência específico.

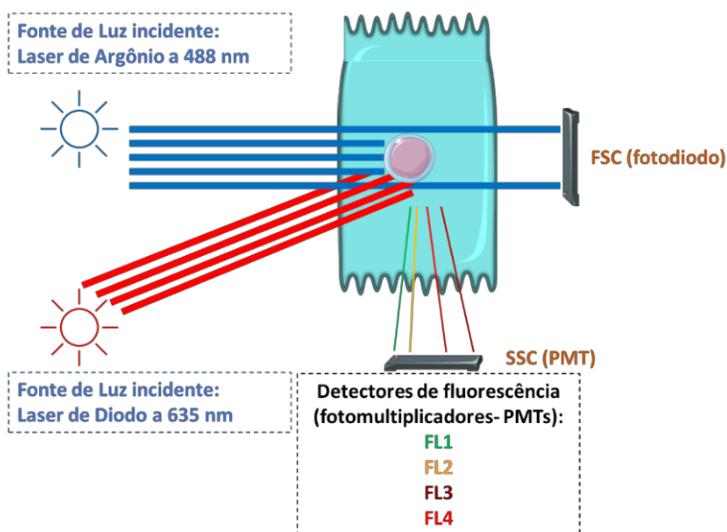


Figura5: Princípio básico da citometria de fluxo. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.



O fotodetector FL1 (Fluorescência 1) capta luz de comprimento de onda de 515 a 545 nm, que corresponde à luz verde. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o FITC. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD3.

O fotodetector FL2 (Fluorescência 2) capta luz de comprimento de onda de 564 a 606 nm, o que corresponde à luz laranja. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o PE. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD8.

O fotodetector FL3 (Fluorescência 3) capta luz de comprimento de onda maior que 670 nm, o que corresponde à luz vinho. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o PerCP. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD45.

O fotodetector FL4 (Fluorescência 4) capta luz de comprimento de onda de 653 a 669 nm, o que corresponde à luz vermelha. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o APC. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD4. Veja na tabela abaixo a combinação de anticorpos/fluorocromos/fotodetector para o reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC:

Tabela 1: Combinação anticorpos/fluorocromos/fotodetector – reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC

Anticorpo conjugado	Fluorocromo	Detector
anti-CD3	FITC	FL-1
anti-CD8	PE	FL-2
anti-CD45	PerCP	FL-3
anti-CD4	APC	FL-4



SISTEMAS

O funcionamento de um citômetro de fluxo é resultado da integração de três sistemas:

- A) Sistema de fluidos
- B) Sistema Óptico
- C) Sistema Eletrônico

O **Sistema de Fluidos** é responsável por transportar as células/partículas em um fluxo contínuo até serem interceptadas pelo feixe de laser. Esse transporte é feito de forma alinhada, para que cada célula/partícula seja individualmente analisada.

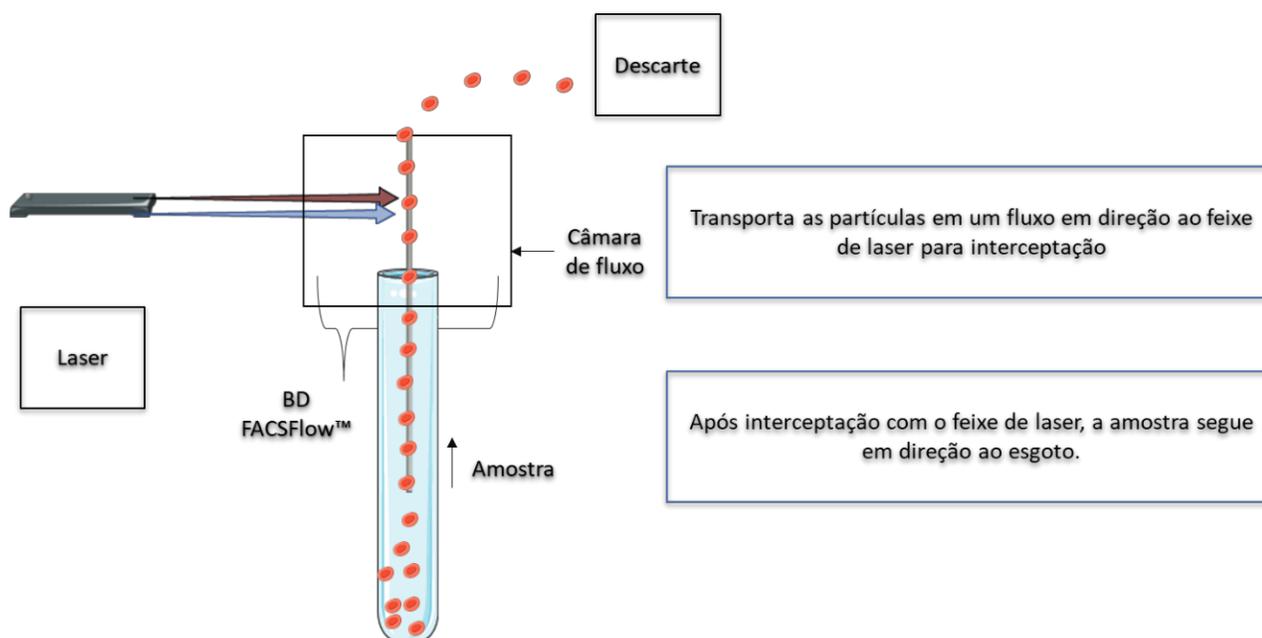


Figura 6: Sistema Fluidico. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

O alinhamento das células ocorre através do princípio da *focalização hidrodinâmica*, que consiste na separação do fluxo de amostra do fluxo de BD FACSCalibur™ por diferença de pressão entre os fluidos. O core de amostra está sempre em uma pressão maior que a BD FACSCalibur™ e tem pressão que pode ser, manualmente alterada. Já a solução BD FACSCalibur™ tem pressão constante e menor que a amostra.



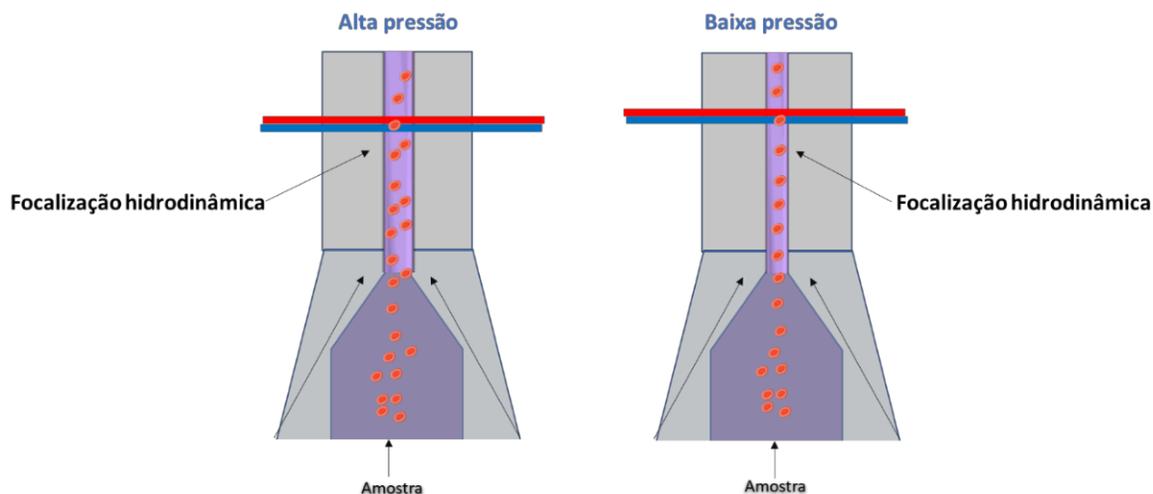


Figura 7: Vazão de amostra. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

O **Sistema Óptico** é composto por componentes de excitação (laser e lentes) e coleta (lentes, espelhos, filtros e fotodetectores).

Os componentes de excitação são responsáveis por dar forma e alinhar o feixe de laser, permitindo, assim, a excitação de um determinado fluorocromo e a dispersão da luz.

O sistema de coleta, por sua vez, é responsável por captar essa dispersão e a luz fluorescente, direcionar os comprimentos de onda para os fotodetectores específicos e receber a informação óptica, que será futuramente digitalizada e armazenada em um computador.

O direcionamento da luz para os fotodetectores é feito por lentes e espelhos dicróicos, posicionados no caminho da luz até os fotodetectores. Diante desses fotodetectores temos ainda filtros ópticos que garantem especificidade na detecção de luz.

Tabela 2: Sistema Óptico

Detector	Filtro	Fluorocromo	Pico de emissão	Cor da Emissão	Excitação	Marcador
FL1	BP 530/30 nm	FITC	520nm	Amarelo-Verde	laser azul	CD3
FL2	BP 585/42 nm	PE	575nm	Vermelho-Laranja	laser azul	CD8
FL3	670 nm LP	PerCP	675nm	Vermelho	laser azul	CD45
FL4	BP 661/16 nm	APC	660nm	Vermelho	laser vermelho	CD4



Uma vez que os sinais luminosos chegam aos detectores, eles precisam ser convertidos em sinais eletrônicos que podem ser processados pelo computador. Essa função é exercida pelo **Sistema Eletrônico**.

À medida que uma partícula entra no feixe de luz do laser é gerado no sistema um sinal elétrico denominado “pulso de voltagem”. Quando os sinais luminosos, ou fótons, alcançam um dos detectores, eles são convertidos em um número proporcional de elétrons que são multiplicados, criando uma corrente elétrica maior. A corrente elétrica se encaminha para o amplificador e é convertida em um pulso. O pulso atinge intensidade máxima quando a partícula está no centro do feixe. À medida que a partícula se afasta do feixe de laser, o pulso retorna ao seu valor inicial.

A altura do pulso, portanto, refere-se ao pico de dispersão de luz, enquanto a largura do pulso refere-se ao tempo de passagem da partícula na frente do laser. No BD FACSCalibur™, a altura do pulso de voltagem é utilizada como valor numérico padrão extraído do pulso de voltagem.

O pulso elétrico recebe um valor digital (número de canais) designado pelo Analog-to-Digital Converter (ADC). Para cada evento interceptado pelos lasers é registrado o valor da altura do pulso de voltagem, em cada parâmetro (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 e FL4), em uma *list mode data*. Em seguida, o sinal luminoso é exibido na posição apropriada no gráfico de dados. Os dados gerados pelo citômetro de fluxo são armazenados de acordo com um formato padrão – FCS (*Flow Cytometry Standard*).

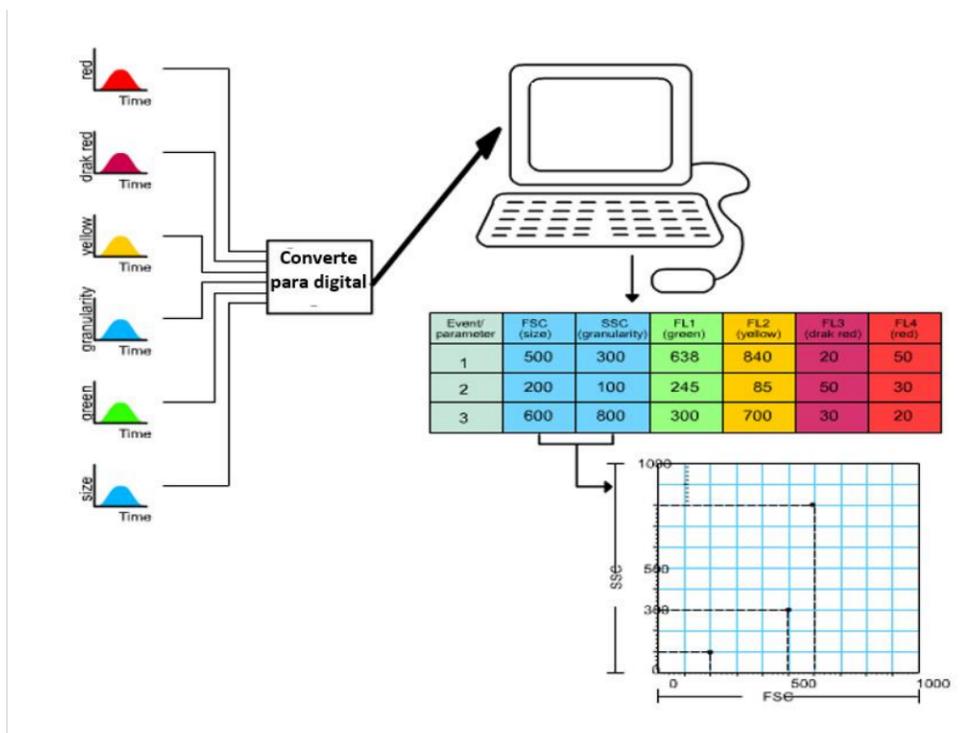


Figura 8: Sistema Eletrônico.



Os dados podem ser visualizados em diversos formatos. Um único parâmetro, FSC ou FITC (FL1), por exemplo, pode ser exibido como um histograma de parâmetro único, em que o eixo horizontal representa o valor do sinal do parâmetro em números de canais (intensidade de fluorescência), enquanto o eixo vertical representa o número de eventos por número de canal. Cada evento é posicionado no canal que corresponde ao valor de altura do pulso de voltagem para aquele parâmetro. Sinais com valores idênticos acumulam-se no mesmo canal. Sinais mais intensos são exibidos em canais localizados à direita dos sinais mais fracos.

Ainda, é possível exibir, simultaneamente, dois parâmetros em um mesmo gráfico: um no eixo X, e o outro no eixo Y. Os gráficos de pontos (*dot plots*) são bastante utilizados para essa representação.

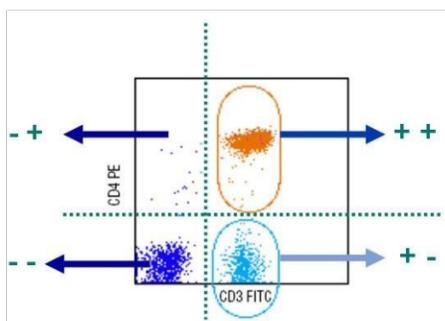


Figura 9: Como interpretar um dot plot.

Nessa seção foi utilizada a referência 7 descrita no capítulo final desse documento. As informações contidas nessa seção também podem ser encontradas no capítulo 1 Introdução das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™ e e nas bulas dos reagentes BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC.

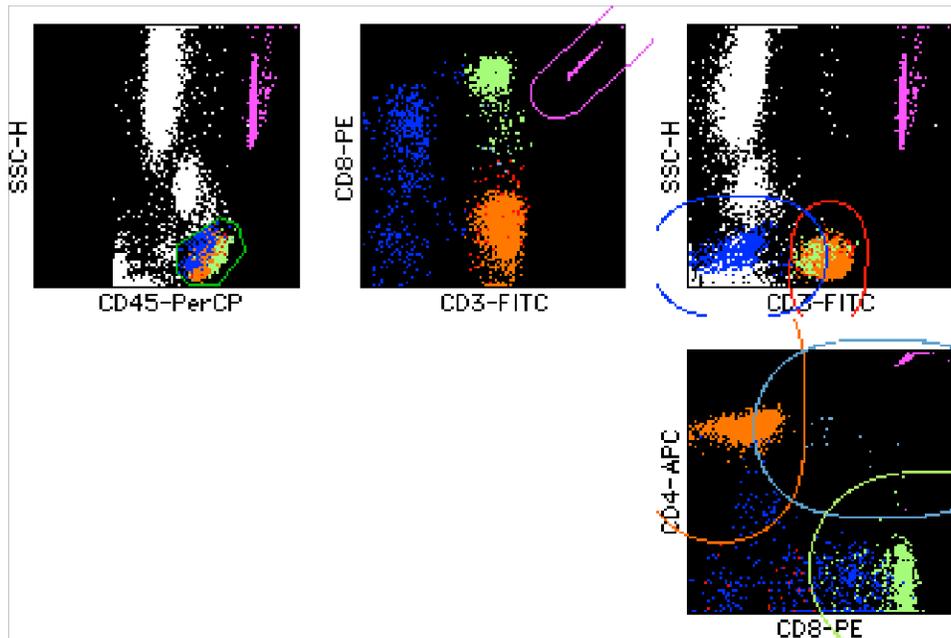
REVISÃO DOS MARCADORES – Quantificação CD4/CD8

A tabela abaixo ilustra a expressão dos marcadores na superfície das células sanguíneas. Isso te ajudará a relembrar como as diferentes subpopulações sanguíneas devem estar distribuídas nos gráficos de citometria gerados pelo BD Multiset™.



Células	FSC	SSC	CD3	CD8	CD45	CD4
Linfócitos Totais	↓	↓	+/-	+/-	+++	+/-
Linfócitos T	↓	↓	+	+/-	+++	+/-
Linfócitos Th	↓	↓	+	-	+++	++
Linfócitos Tcito	↓	↓	+	++	+++	-
Linfócitos T DP	↓	↓	+	+	+++	+
Linfócitos B	↓	↓	-	-	+++	-
Linfócitos NK	↓	↓	-	+	+++	-
Monócitos	Intermediário	Intermediário	-	-	++	+
Granulócitos	↑	↑	-	-	+	-

VISUALIZAÇÃO DOS DADOS NO BD MULTISSET™



Verdadeiro ou Falso?

___ Todas as células CD3 também expressam CD45.

___ Com a metodologia 4 cores, é necessário realizar o leucograma para se obter a contagem de linfócitos totais.

___ Os linfócitos totais compreendem somente os linfócitos T e B.

___ As células NK também expressam CD8.

___ Todas as células CD45 positivas expressam CD3.

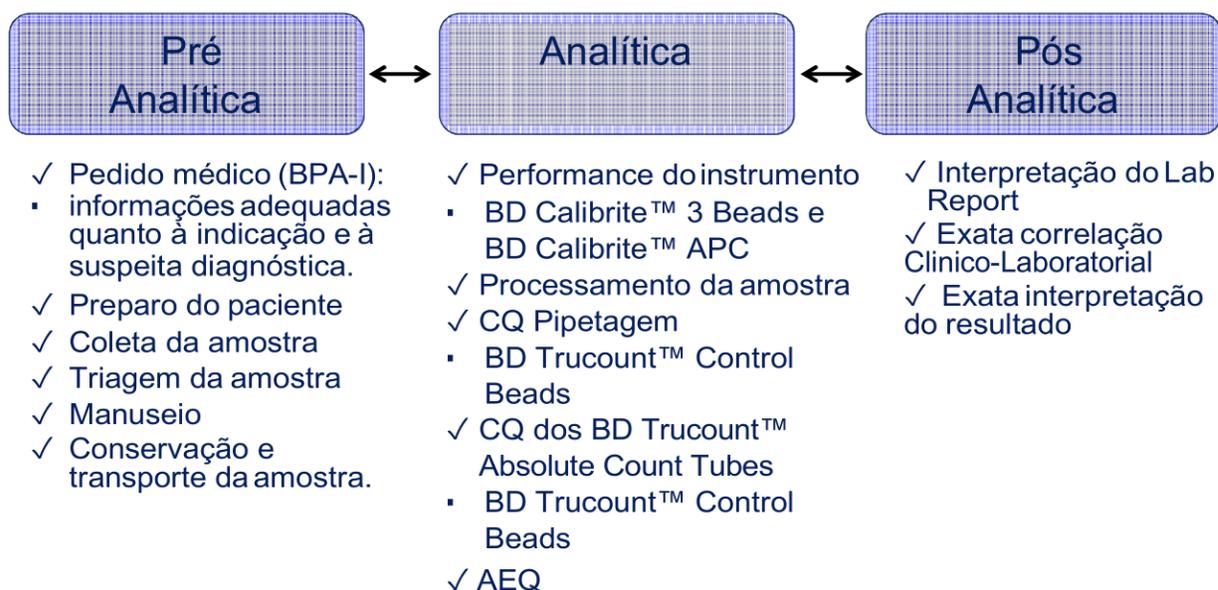
___ Todos os linfócitos expressam CD3.



CONTROLE DE QUALIDADE NA ROTINA DE QUANTIFICAÇÃO CD4/CD8

A qualidade de um resultado está diretamente relacionada a três fases distintas do processo de análise: a *fase pré-analítica*, a *fase analítica* e a *fase pós-analítica*. Na rotina de quantificação de linfócitos T CD4/CD8 os processos abaixo se dividem da seguinte forma em cada fase:

A qualidade de um resultado está diretamente relacionada a três fases distintas do processo de análise: a **fase pré-analítica**, a **fase analítica** e a **fase pós-analítica**.



A) Fase Pré Analítica

Nessa fase, daremos foco as etapas seguintes: **Coleta da amostra**, **Triagem da amostra** e **Conservação e transporte da amostra**.

- ✓ **Coleta da amostra:** a amostra deve ser coletada em tubos EDTA K₂ ou K₃, armazenada em temperatura ambiente 20°C a 25°C até o processamento, que deve ocorrer em até no máximo 48 horas após a coleta. O reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC não foi validado para utilização em amostras coletadas com heparina ou ácido cítrico em dextrose (ACD).
- ✓ **Triagem da amostra:** verificar se a amostra está devidamente identificada, se a requisição médica confere com a identificação do paciente no tubo, se a amostra foi colhida com EDTA e se o volume de



sangue colhido é o especificado. Nessa fase, é muito importante que as características físicas da amostra também sejam observadas (ipemia, icterícia, hemólise e coágulos e/ou fibrina). **As amostras de sangue hemolisadas, com fibrina ou com coágulos não devem ser processadas.** Embora o processo de hemólise seja classificado como a lise das hemácias, o resultado dessa lise é a liberação de uma série de moléculas pró inflamatórias que acabam por influenciar a sobrevivência das outras células do sangue. Por isso, amostras hemolisadas devem ser rejeitadas. A hemólise fora do organismo, ou seja, *in vitro* pode acontecer quando o sangue é armazenado sob temperaturas extremas (muito altas ou muito baixas), em casos em que o sangue é colhido de forma inadequada ou ainda quando a proporção de sangue e anticoagulante não é respeitada (amostras com volume de sangue menor que o recomendado para o tubo).

- Ideal: $1,5 \pm 0,5$ mg/mL de sangue). Amostras que chegarem ao laboratório fora do intervalo de temperatura aceitável, mas que não apresentem características físicas de hemólise podem ser processadas porém, no laudo de liberação do resultado da amostra deve estar contida a informação relacionada ao transporte ou acondicionamento incorreto da mesma. Amostras coaguladas ou com fibrina não devem ser processadas, pois a presença de coágulos e fibrinas podem causar o entupimento do citômetro e ainda prejudicam a marcação homogênea da amostra, fazendo com que os resultados gerados não sejam verdadeiros. **Amostras de sangue ictericas e lipêmicas podem ser processadas normalmente e adquiridas no citômetro.** Para esses dois tipos de amostra, onde se tem a presença de moléculas que atrapalham a dispersão de luz, recomendamos que a aquisição seja feita em baixa pressão de amostra (RUN/LO) para se atingir a melhor resolução possível nos resultados.

- ✓ **Conservação e transporte da amostra:** a amostra *in natura* deve ser armazenada em temperatura ambiente (20°C a 25°C) até o seu processamento (dentro de 48h). Depois de processada a amostra deve ser armazenada em temperatura ambiente 20°C a 25°C sob abrigo da luz e adquirida no citômetro em até no máximo 24 horas. A amostra deve ser transportada em temperatura ambiente (20°C a 25°C). Temperaturas extremas (congelamento e/ou superiores a 37°C) causam destruição celular e afetam os resultados da citometria de fluxo. No transporte de amostras, em regiões muito quentes, as amostras devem ser armazenadas em recipiente isolado e colocadas dentro de outro recipiente contendo gelo reciclável (-20°C) e material absorvente, se necessário. Dessa forma é possível manter as amostras em temperatura ambiente, mesmo em regiões muito quentes. As informações dessa seção podem ser encontradas na bula do BD Trucount™ Absolute Count Tubes e BD Multitest™ CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP/CD4APC.



B) Fase Analítica

Nessa fase, daremos foco as etapas: **Controle de qualidade instrumental, Processamento da amostra, Controle de qualidade de pipetagem e BD Trucount™ Absolute Count Tubes.**

Controle de qualidade instrumental/Calibração – BD FACSCalibur™

A calibração do instrumento constitui uma das principais etapas do trabalho com citometria de fluxo. Ela garante a correta distribuição das células nos gráficos e mostra se o instrumento utilizado na aquisição e análise dos dados está operando com total eficiência. Para a calibração do BD FACSCalibur™, o reagente BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC.

O BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC juntos são um conjunto que reúne *beads* não marcadas (*unlabeled*), *beads* marcadas somente com FITC, *beads* marcadas somente com PE, *beads* marcadas somente com PerCP e *beads* marcadas somente com APC. As *beads* do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC são usadas para calibrar e verificar a linearidade do equipamento, monitorando sua performance diária. Por isso a calibração do equipamento deve ser realizada todos os dias em que a rotina for executada. O software utilizado para calibrar o sistema é o BD FACSCComp™.

A) Preparo do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC

O preparo do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC é feito em dois tubos (tubo A e tubo B) e os frascos de cada uma das *beads* deve ser muito bem homogeneizado antes de serem adicionados aos respectivos tubos

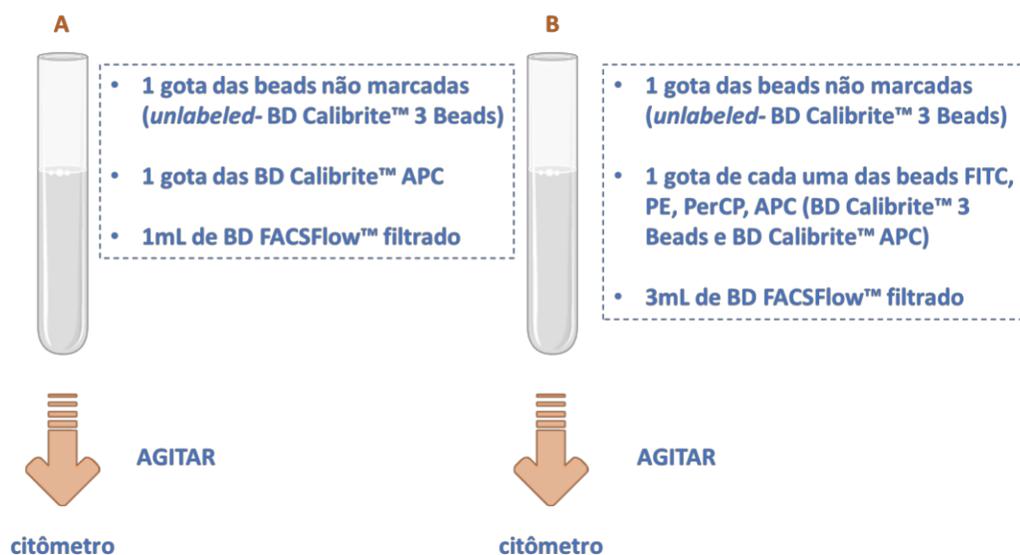
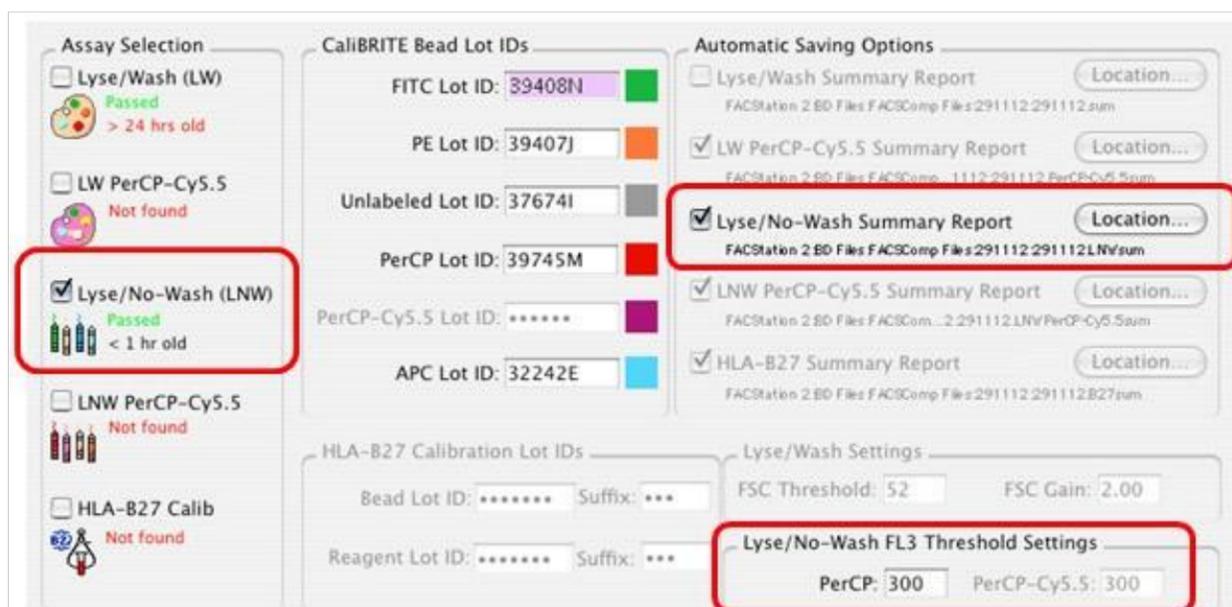


Figura 10: Preparo do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art mart.servier.com/.



A BD recomenda que a calibração seja feita imediatamente após o preparo do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC, porém, caso isto não seja possível, o reagente deve ser mantido sob proteção da luz e armazenado por 8h entre 2 e 8°C ou, se as beads de PerCP estiverem incluídas, por 1 hora entre 2 e 8°C.

Durante a calibração é realizado o ajuste automático dos parâmetros (ou *settings*) do instrumento pelos menus mostrados a seguir. Durante o processo de calibração também é realizada a verificação do Time Delay e Teste de Sensibilidade. O ensaio em que a calibração deve ser realizada para a rotina de CD4/CD8 é o Lyse No Wash:



As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 4: Controle de qualidade do equipamento, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™ e nas bulas dos reagentes BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC.

B) Ajuste das voltagens

Durante a primeira fase da calibração é realizado o ajuste das voltagens dos PMTs, que é feito com tubo A (*beads* não marcadas e *beads* marcadas com APC).

O BD FACSCComp™ ajusta as voltagens dos PMTs de modo que as populações de *beads* apareçam nas regiões-alvo pré-definidas. A figura a seguir ilustra um exemplo do ajuste de voltagem do PMT SSC. Se a população de *beads* aparecer abaixo da região-alvo, a voltagem do PMT de SSC será aumentada pelo BD FACSCComp™, se estiver achatada na parte de cima do gráfico (acima da região-alvo), a voltagem do PMT de



SSC será diminuída. Ainda com o tubo A, o BD FACSComp™ ajusta as voltagens dos PMTs de fluorescência (FL1, FL2, FL3 e FL4). Para os três primeiros parâmetros de fluorescência, a região-alvo de posicionamento é o quadrante duplo-negativo no dot plot, pois não há beads fluorescente para nenhum dos canais relacionados (FL1, FL2 e FL3) no tubo A. Porém, nesse tubo existem beads APC, portanto o ajuste de voltagem do fotodetector FL4 tem como alvo posicionar as beads APC na região positiva do histograma de FL4.

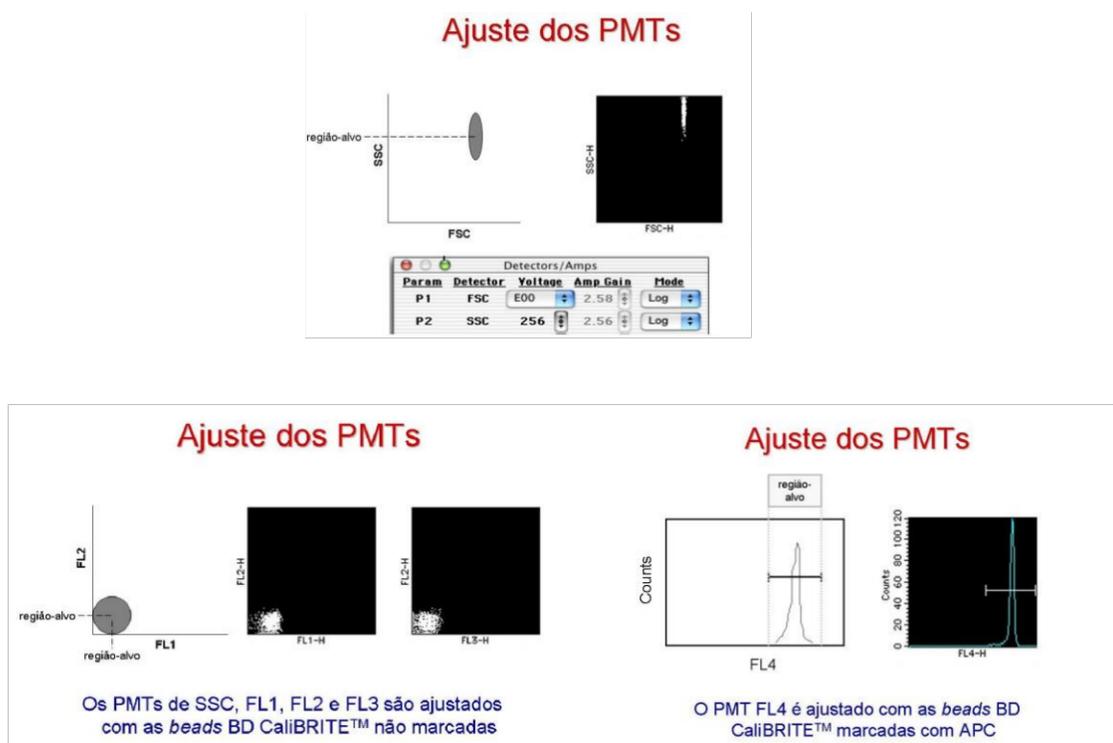


Figura 11: Ajuste da voltagem dos PMTs.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 4: Controle de qualidade do equipamento, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.

C) Verificação do Time Delay

A próxima fase da calibração, ainda realizada com o tubo A, é a verificação do funcionamento do Time Delay.



Para entender o funcionamento do *Time Delay*, talvez seja mais fácil ver o que poderia ocorrer se este funcionamento estivesse prejudicado (falha no processo). Para entender o *Time Delay* é importante ter em mente que os eventos não interceptam o laser azul e o laser vermelho ao mesmo tempo. Antes de interceptar o feixe de luz do laser azul, o evento passa pelo feixe de luz do laser vermelho. O tempo que um evento leva para passar de um laser para outro é de aproximadamente 36 microssegundos.

O exemplo a seguir ilustra uma célula duplo-positiva para PE (FL2) e APC (FL4). Na falha do *Time Delay*, uma célula duplo positiva para esses dos fluorocromos ao interceptar o feixe de luz do laser vermelho geraria uma informação primeiro para o detector FL4 (APC) e quando passasse pelo feixe de luz do laser azul, geraria uma informação para o detector FL2 (PE). A representação gráfica dessa situação seria como mostrado abaixo, um evento no quadrante de FL4 e outro evento no quadrante de FL2, ou seja, uma mesma célula seria mostrada no resultado como se fosse duas células diferentes. Quando o funcionamento do *Time Delay* está correto, ocorre um atraso virtual do sinal gerado pelo laser vermelho de modo que esse sinal só seja liberado no momento em que a célula passar pelo laser azul. Assim, uma célula duplo positiva para fluorocromos excitados pelo laser azul e pelo laser vermelho, serão mostradas no gráfico onde há a combinação de parâmetros dos dois lasers como um único ponto no quadrante duplo positivo do gráfico. É por essa razão que não recomendamos o uso do equipamento se a verificação do *Time Delay* falhar durante o processo de calibração. As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 4: Controle de qualidade do equipamento, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.

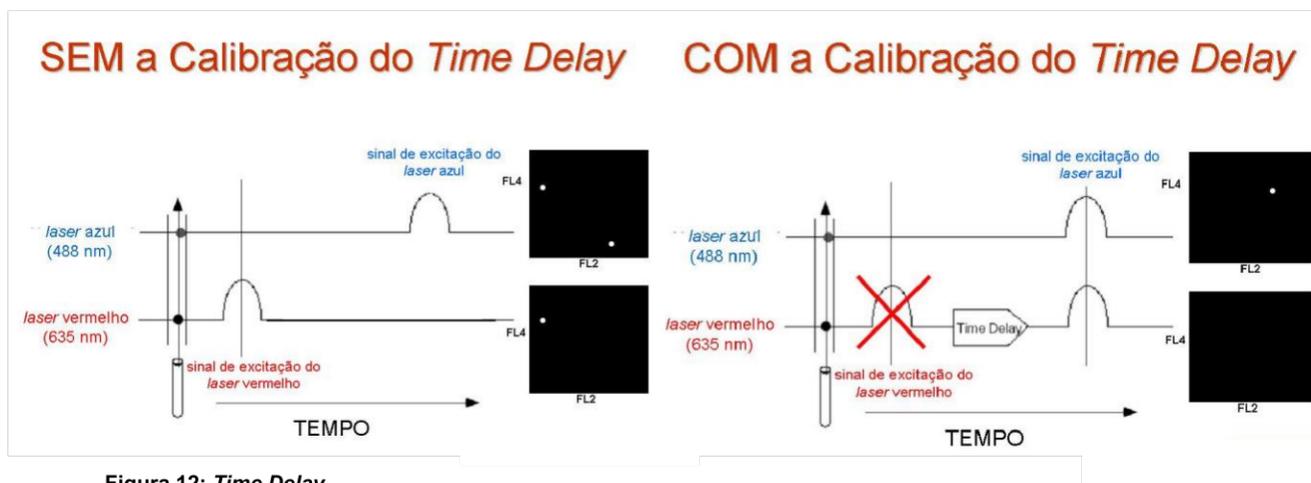


Figura 12: *Time Delay*



D) Ajuste das compensações

O passo seguinte é o ajuste das compensações, realizado com o tubo B.

A emissão de fluorescência dos diversos fluorocromos ocorre em um intervalo de comprimento de onda e esse intervalo pode ser parecido entre eles. O resultado dessa similaridade é a detecção de parte desse espectro por fotodetectores de fluorescência não específicos. O que é feito durante a etapa de compensação do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC é a retirada da fluorescência interferente nos fotodetectores não específicos. Por exemplo, o detector FL1 pode captar a luz fluorescente emitida pelo fluorocromo PE, mas esta luz deveria ser captada pelo detector FL2, enquanto que o detector FL1 deveria captar apenas a luz emitida pelo fluorocromo FITC. Assim, pode-se afirmar que a luz emitida por PE e captada pelo fotodetector FL1 é uma interferência de PE (FL2) no fotodetector FL1. Quando o software ajusta a compensação FL1 -%FL2, ele está retirando a interferência de PE no detector FL1. O BD FACSComp™ realiza o ajuste de todas as compensações de maneira a posicionar cada grupo de beads fluorescentes nos quadrantes corretos de cada gráfico.

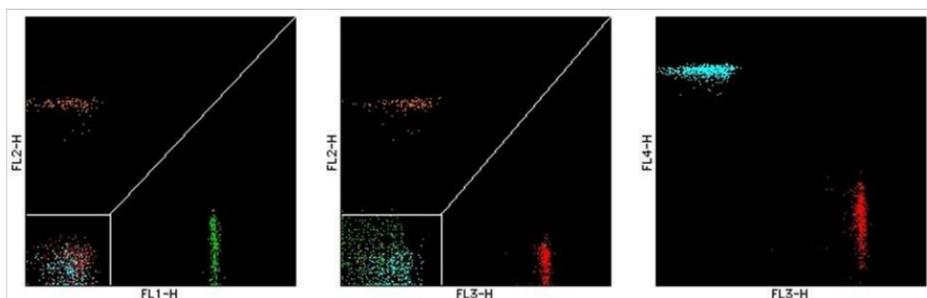


Figura 13: Ajuste das compensações.

No exemplo abaixo, é possível notar a interferência da fluorescência de PE no detector FL1 e FL3. Quais ajustes são necessários para que o problema de interferência seja resolvido?



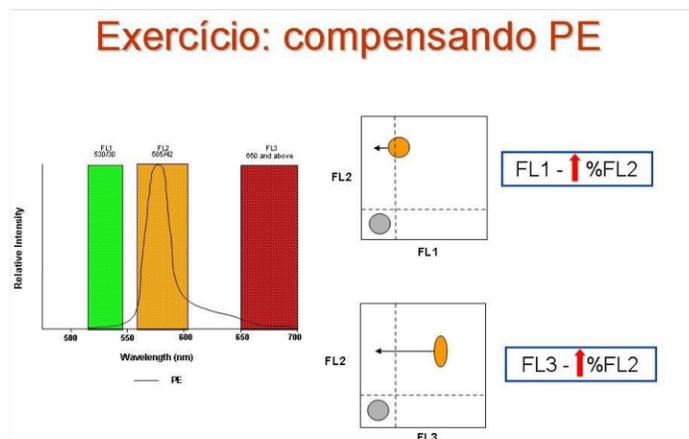


Figura 14: Ajuste das compensações.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 4: Controle de qualidade do equipamento, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.

E) Threshold

O threshold é estabelecido no momento da escolha do ensaio no BD FACSComp™. A decisão da escolha do ensaio está vinculada ao protocolo de processamento da amostra. Na rotina CD4/CD8, o protocolo de processamento da amostra é realizado no formato Lyse / No Wash (lise/sem lavagem) onde os eritrócitos são lisados e a amostra não é submetida a um processo de lavagem para a retirada de interferentes. O threshold nesse caso é estabelecido no parâmetro FL3 no valor de 300. O resultado dessa configuração de threshold é o processamento eletrônico dos sinais que tiverem intensidade de fluorescência para FL3 (CD45 PerCP) maior que 300.

O estabelecimento do threshold é importante para diminuir a interferência dos debris (restos celulares) nas contagens celulares. Para gerar valores percentuais e absolutos precisos, é necessário que sejam adquiridos, no mínimo, 2000 eventos de linfócitos e, no mínimo, 500 eventos de beads. Como a quantidade de hemácias lisadas está em grande número na amostra, estes restos de eritrócitos poderiam influenciar de maneira negativa a contagem dos eventos. As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 4: Controle de qualidade do equipamento e adicionalmente no Capítulo 5, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.



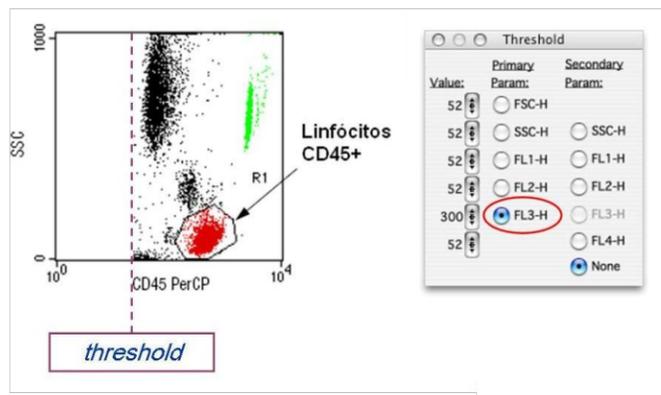


Figura 15: Threshold.

F) Teste de Sensibilidade

A etapa final da calibração é a realização do teste de sensibilidade e nessa etapa o BD FACSComp™ utiliza o tubo B.

A função do teste de sensibilidade é avaliar a capacidade de cada fotodetector em distinguir o que é sinal e o que é ruído. Na figura a seguir vemos o teste de sensibilidade para os detectores FL1, FL2 e FL3. O sinal para FL1 é a luz emitida pelas *beads* FITC; para FL2, a luz emitida pelas *beads* PE; para FL3, a luz emitida pelas *beads* PerCP. Para estes três detectores, o ruído é a autofluorescência das *beads* não marcadas quando excitadas pelo laser azul.

Quanto maior a separação entre ruído e sinal, maior é a sensibilidade do detector, ou seja, maior é a sua habilidade de não confundir o verdadeiro sinal com o sinal indesejável (ruído). O número de lote de cada bead do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC estabelece um valor mínimo de separação entre os picos de sinal e de ruído para cada um dos detectores. Se a separação entre o pico de ruído e o pico de sinal for maior que o valor mínimo estabelecido pelo número de lote do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC, o parâmetro em questão passa (*Pass*) no teste de sensibilidade; se for menor, o parâmetro falha no teste de sensibilidade (*Fail*).

Para o detector FL4, o sinal é a luz emitida pelas *beads* marcadas com APC e o ruído é a luz emitida pelas *beads* marcadas com PerCP.

Para o detector SSC, o ruído é gerado por um pulso eletrônico em FSC. Para FSC, o ruído é o menor sinal que este detector conseguir captar.



Ao final da calibração, o BD FACSComp™ gera de um laudo denominado BD FACSComp™ Report, que deve ser analisado atenciosamente antes de a rotina ser iniciada. *As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 4: Controle de qualidade do equipamento, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.*

G) Interpretação do BD FACSComp™ Report

O laudo final da calibração deve se encaixar nas condições mostradas abaixo:

1. Todos os parâmetros (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 e FL4) devem **passar no teste de sensibilidade (Pass)**;
2. A potência do laser azul (*blue laser power*) **DEVE ser igual a 14,5 ±0,5 mWatts**;
3. Os valores de compensação **DEVEM ser menores que 50%**;
4. O resultado da calibração do **Time Delay deve ser Pass** (“Time Delay calibration passed”).

Se todos os pontos do FACS Comp Report estiverem de acordo com as recomendações acima, é necessário clicar em SET UP para colocar os parâmetros gerados em uso e o equipamento estará pronto para a execução da rotina.



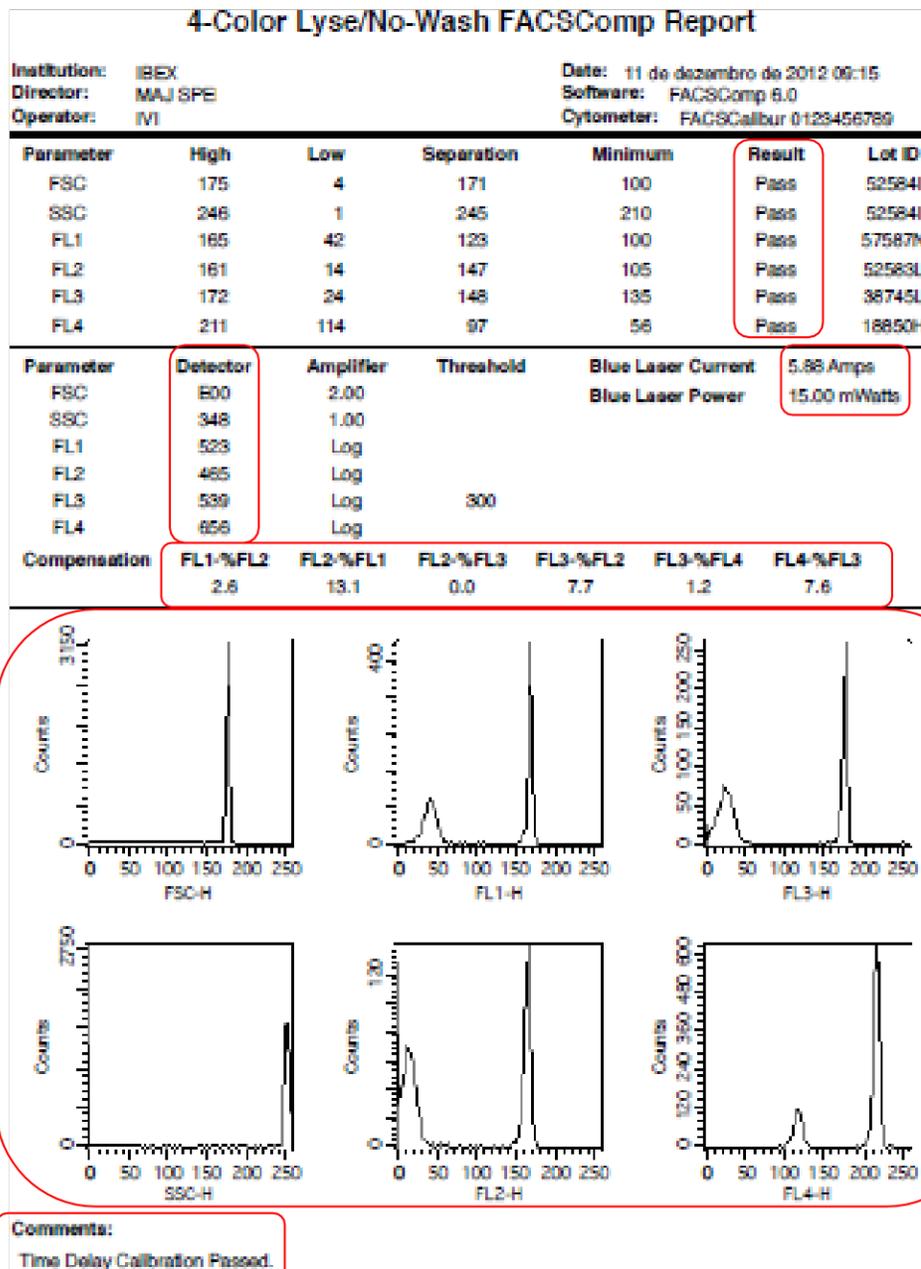


Figura 16: BD FACSComp™ Report



H) Instrument Settings

Durante a calibração são gerados valores de voltagem para cada parâmetro, valores de compensação e threshold. Esses valores são chamados de *instrument settings* e são salvos no instrumento ao final da calibração. São essas as informações que o BD Multiset™ utilizará para posicionar as populações celulares nas devidas regiões alvo. Se quisermos recuperar os *instruments settings* de uma calibração, basta abrir o arquivo **Calibfile.LNW** presente em **FACStation>BDFiles>InstrumentSettingsFiles** clicar em **Open**, **Set** e, em seguida, **Done**. Ou ainda, é possível recuperar esses *settings* de uma amostra que contenha os valores de calibração de interesse. As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo Capítulo 5: Processar amostras manualmente, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.

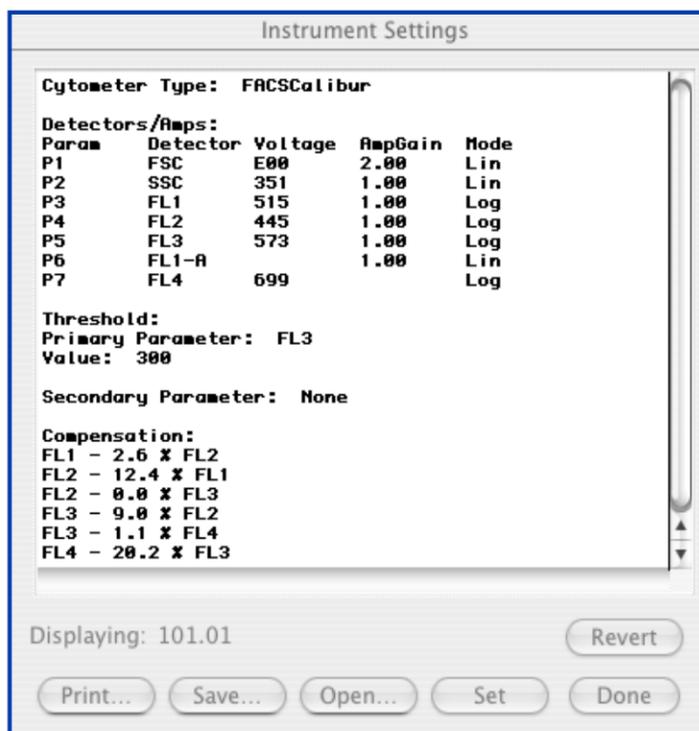


Figura 17: Instrument Settings



EXERCÍCIOS

1. Qual é o reagente usado para calibração e controle de qualidade do BD FACSCalibur™? O que o compõe?

2. Quando devemos realizar a calibração do BD FACSCalibur™?

3. Descreva o preparo do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC.

4. Se a calibração do Time Delay falhar, pode-se executar a rotina? Por quê?



PROBLEMAS E SOLUÇÕES

A. Calibração

Durante a realização da rotina, todos os passos devem ser constantemente monitorados para que se possa detectar rapidamente possíveis problemas que resultam em erros no laudo final. Ao ligar o citômetro, antes de iniciar qualquer procedimento de leitura, deve-se esperar 15 minutos para que o laser atinja a potência ideal de trabalho e se mantenha estável.

A primeira etapa da rotina é a calibração do instrumento utilizando as partículas BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC. Os primeiros erros podem ocorrer durante o preparo dos tubos A e B. Por isso os passos a baixo devem ser respeitados:

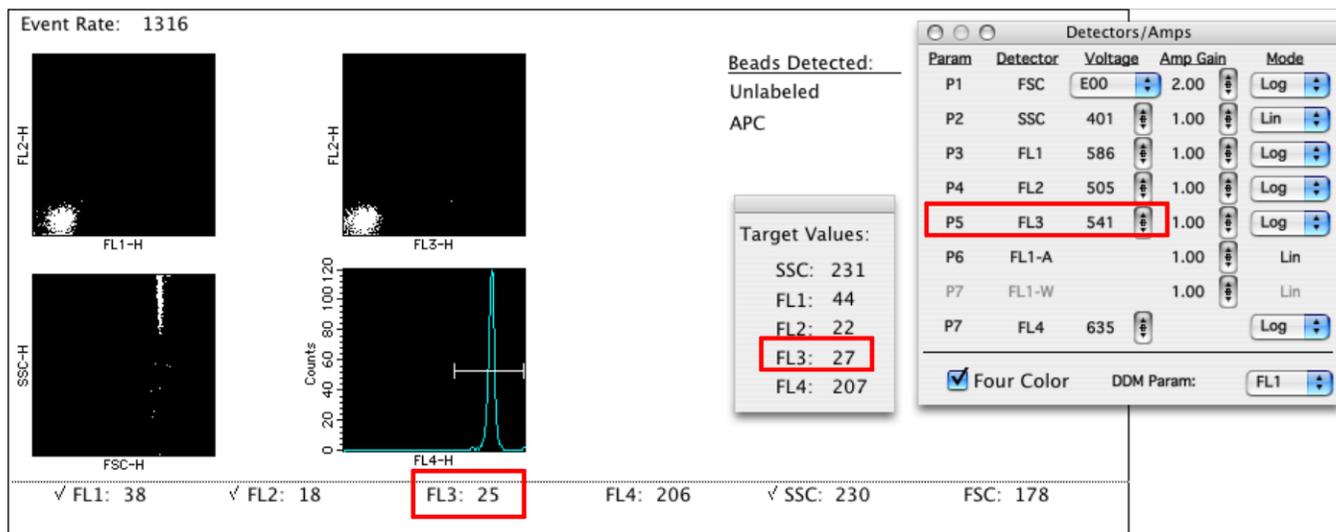
- Homogeneizar bem cada frasco de BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC™ antes de pingar as gotas nos tubos. Isso garante a suspensão completa das partículas.
- Certifique-se que as partículas não passaram da data de validade impressa na etiqueta.
- Se a suspensão preparada não for fresca, prepare uma solução fresca de partículas e repita o procedimento. Partículas usadas após o período de estabilidade começam a apresentar uma diminuição na separação entre populações marcadas e não-marcadas, resultando em falha no Teste de Sensibilidade.
- Abra novos frascos de partículas caso suspeite de contaminação microbiana.
- Verifique se o sistema de fluidos do instrumento está livre de bolhas ou debris. Se a limpeza do instrumento for necessária, verifique o guia do usuário do citômetro para instruções.

Os principais erros na calibração podem ocorrer nas etapas mostradas abaixo:



1. Ajuste na voltagem dos PMT:

a) O ajuste das voltagens não é feito automaticamente



Causas	Soluções
Contagem de eventos abaixo de 400 eventos/seg	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agite o tubo 2. Verifique se o citômetro está em RUN/HIGH 3. Adicione uma gota das beads que apresentarem baixa contagem de eventos
O tempo para o ajuste ultrapassou 75 segundos	Realize o ajuste manual dos PMTs que não foram ajustados
Bolhas na célula de fluxo	No painel de fluídos do equipamento realize PRIME
Sujeira ou presença de cristais na célula de fluxo	Realize a limpeza do sistema – LIMPEZA DO SISTEMA FLUIDICO



b) A voltagem dos PMTs varia mais que 100 volts

Parameter	High	Low	Separation	Minimum	Result	Last ID
FSC	185	85	100	100	Pass	524371
SSC	244	1	243	210	Pass	524371
FL1	187	45	138	100	Pass	528540
FL2	188	15	171	150	Pass	521451
FL3	172	24	148	135	Pass	528540
FL4	209	136	73	44	Pass	364721

Parameter	Detector	Amplifier	Threshold	Blue Laser Current	5.24 Amps
FSC	630	2.00		Blue Laser Power	15.00 mWatts
SSC	348	1.00			
FL1	953	Log			
FL2	482	Log			
FL3	667	Log	300		
FL4	917	Log			

Compensation	FL1-A/FL3	FL3-A/FL1	FL2-A/FL3	FL3-A/FL2	FL3-A/FL4	FL4-A/FL3
	5.2	14.0	0.0	11.8	1.2	21.2

Comments:
Time Delay Calibration Passed. SSC (pmc) changed by 100 or more volts.

Causa	Solução
Sujeira ou presença de cristais na célula de fluxo	Realize a limpeza do sistema – LIMPEZA MENSAL
Bolhas na célula de fluxo	Dê PRIME
Número incorreto do lote ID das beads	Corrigir o número do lote

c) As beads APC não são detectadas

Event Rate: 855

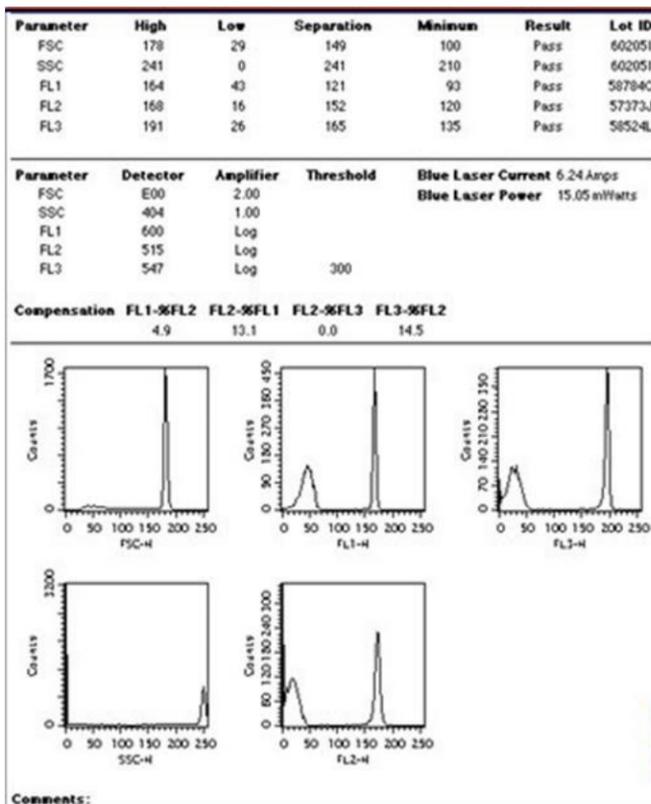
Beads Detected: Unlabeled

Param	Detector	Voltage	Amp Gain	Mode
P1	FSC	E00	2.00	Log
P2	SSC	404	1.00	Lin
P3	FL1	600	1.00	Log
P4	FL2	515	1.00	Log
P5	FL3	546	1.00	Log
P6	FL1-A		1.00	Lin
P7	FL1-W		1.00	Lin
	FL4	100		Log

FL1: 44	FL2: 22	FL3: 27	SSC: 226	FSC: 178
---------	---------	---------	----------	----------



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8 BD FACSCalibur™



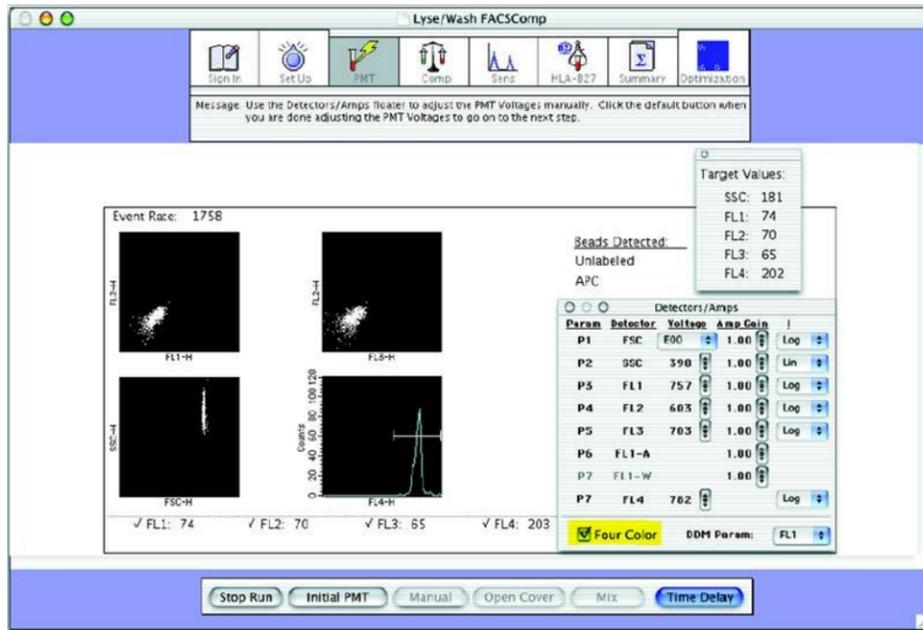
Causa	Solução
Não colocou APC no tubo A	Adicionar as beads APC no tubo A
O laser vermelho está desligado	Selecionar a opção FOUR COLOR em Detectors/Amp
Voltagem alta de FL4	Ajustar a voltagem manualmente

DICA: Deletar o arquivo CalibeFile.LNW no diretório:
FACStation > BD Files > InstrumentSettingsFiles >
CalibeFile.LNW

As figuras a seguir exemplificam como solucionar situação relatada na segunda linha da tabela acima, quando o laser vermelho está desligado/FL4 desabilitado Para isso ativar no BDPAC "FL4 Option Present" e/ou selecionar a opção FOUR COLOR em Detectors/ Amp. como mostram as figuras a seguir:



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8 BD FACSCalibur™

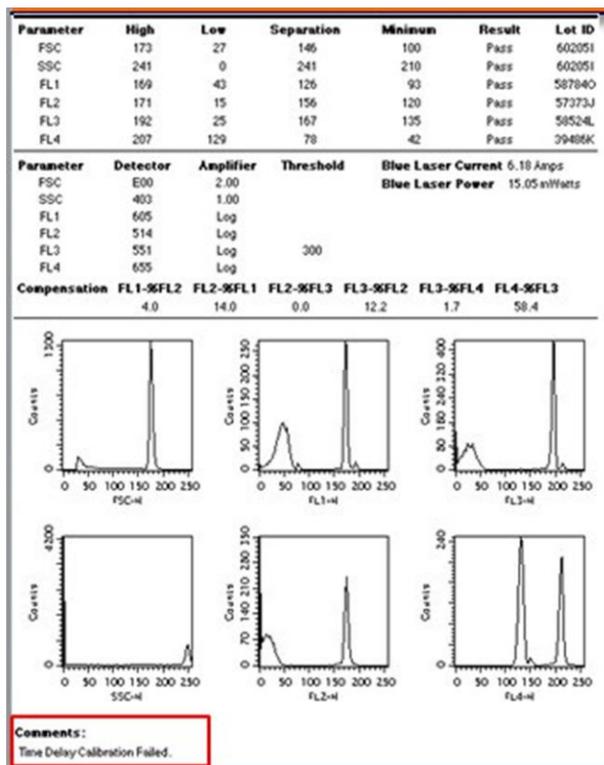


DICA: Deletar o arquivo CalibeFile.LNW em: FACStation > BD Files > InstrumentSettings Files > CalibeFile.LNW.



2. Verificação do Time Delay

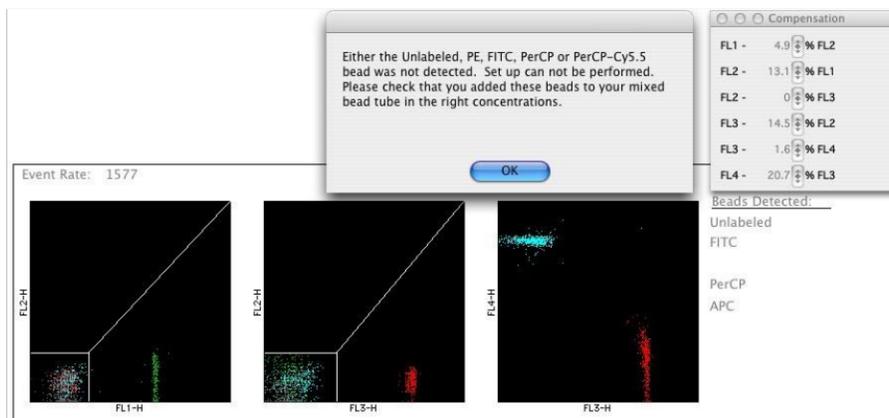
a) Falha na calibração do Time Delay



Causa	Solução
Bolha na célula de fluxo	Prime
Taxa de eventos baixa para esferas APC	<ol style="list-style-type: none"> 1. Agite o tubo 2. Configure a taxa de fluxo como HI 3. Adicione esferas APC ao tubo de esferas não marcada +APC (tubo A)

3. Ajuste das compensações

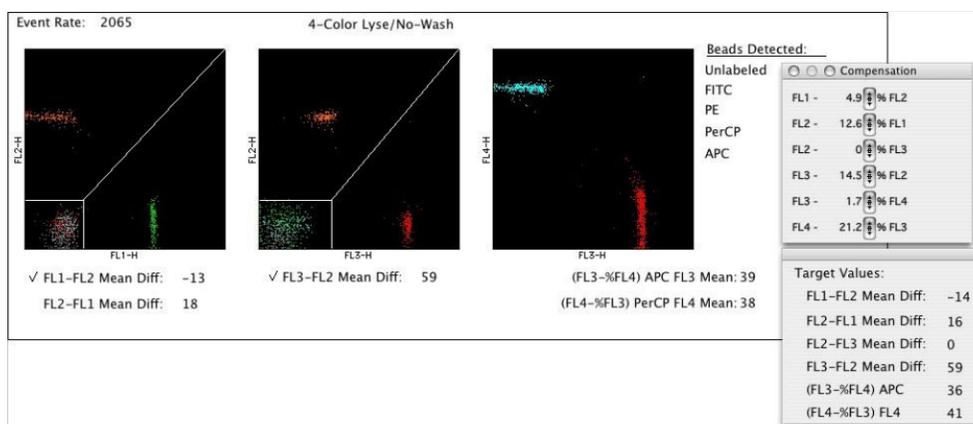
a) Uma ou mais beads não são detectadas



Causas	Soluções
Não adição das beads que estão faltando	Adicionar as beads que estiverem faltando, agitando o frasco de beads antes de pingar
Falta de agitação dos frascos das beads	Homogeneizar as beads antes do uso
Beads muito diluídas – Solução BD FACSTFlow™ > 3mL	Preparar um novo tubo B
Falha de software	Fechar e abrir novamente o BD FACSCComp™

Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

b) O ajuste das compensações não é feito automaticamente

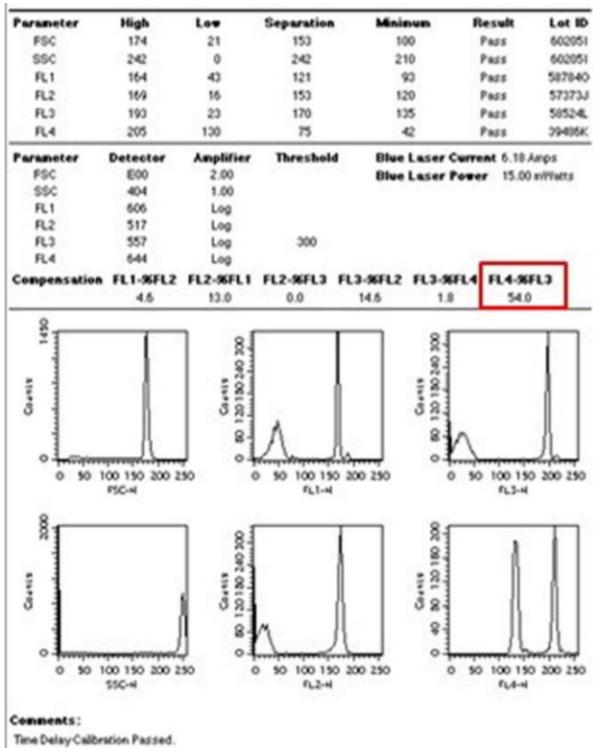


Causas	Soluções
Contagem de eventos abaixo de 400	1. Agite o tubo B 2. Verifique se o citômetro está em RUN/HIGH 3. Adicione esferas ao tubo
O tempo para o ajuste ultrapassou 75 segundos	Faça a compensação manualmente
Tubo B preparado há muito tempo	Preparar um novo Tubo



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8 BD FACSCalibur™

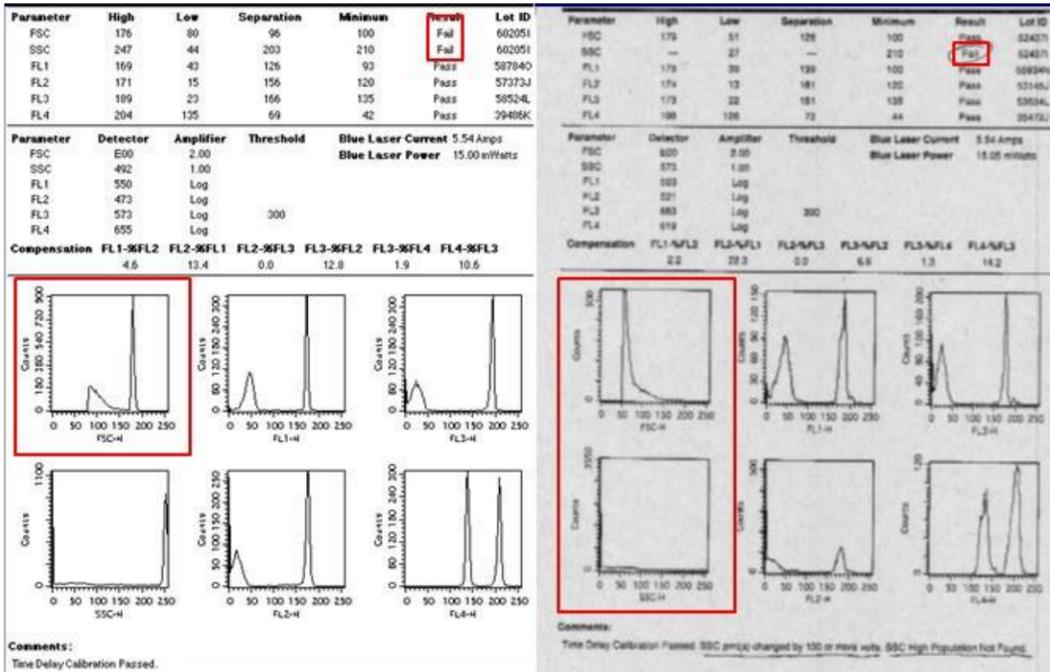
c) Compensação com valor maior que 50%



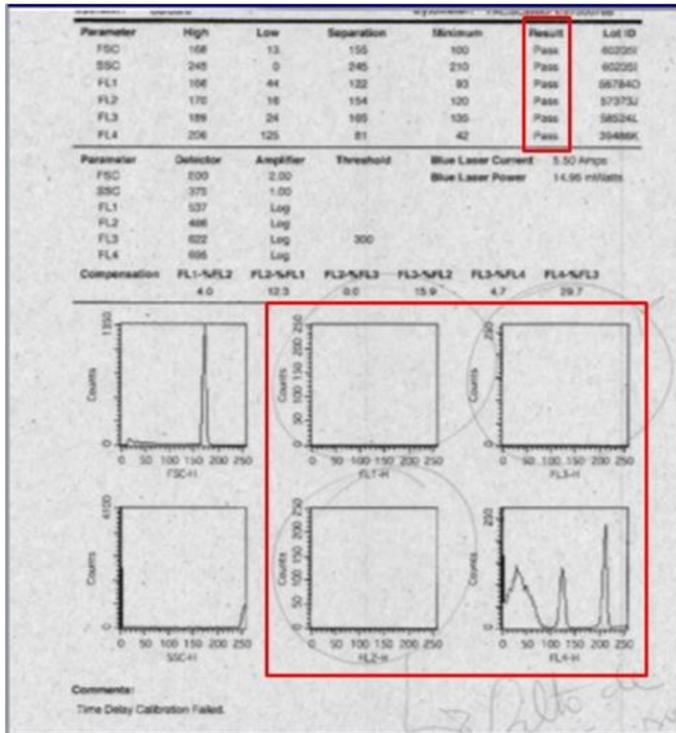
Causa	Solução
Bolha na célula de fluxo	Prime
Tubo B preparado há muito tempo e mantido fora das condições ideais	Preparar um novo mix de BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC Rerun FACSComp™
Valores alvos incorretos	Contatar a BD Biosciences caso isso ocorra



1. Teste de sensibilidade



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8 BD FACSCalibur™



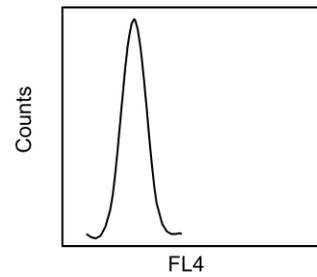
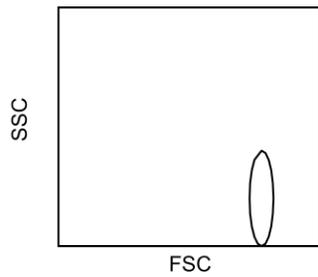
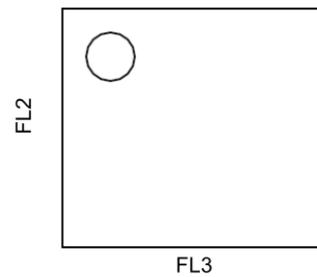
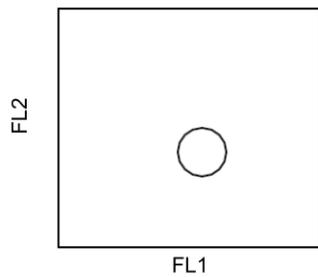
Causa	Solução
Número do Lot ID incorreto	Entrar com o número correto na tela de Set up

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 9: Resolução de problemas, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.



EXERCÍCIOS

1. Imagine que você está correndo o tubo A do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC no BD FACSComp™ e as populações aparecem como mostrado abaixo. Para cada gráfico, desenhe a região-alvo da população e descreva como você a posicionaria nessa região.



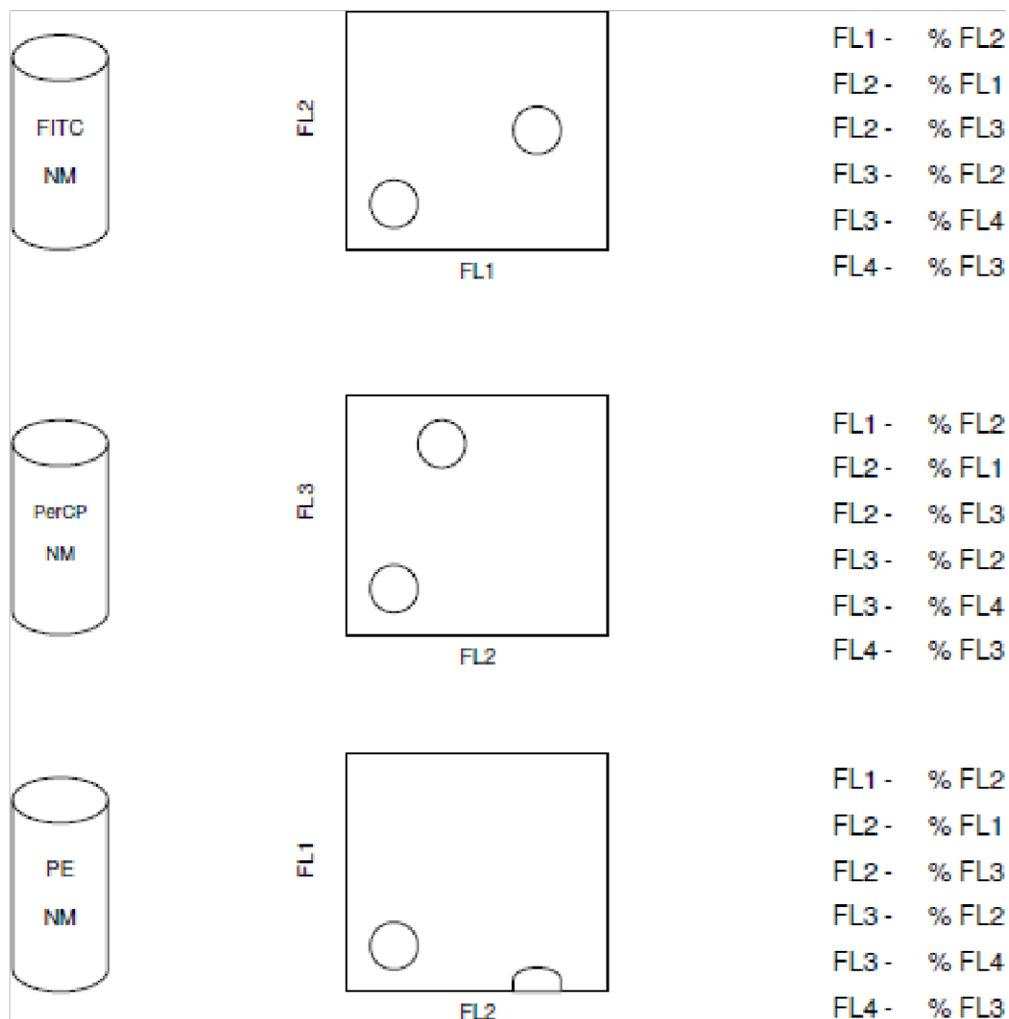
2. Descreva, com suas palavras o que é a calibração do *Time Delay* e por que esta é necessária.

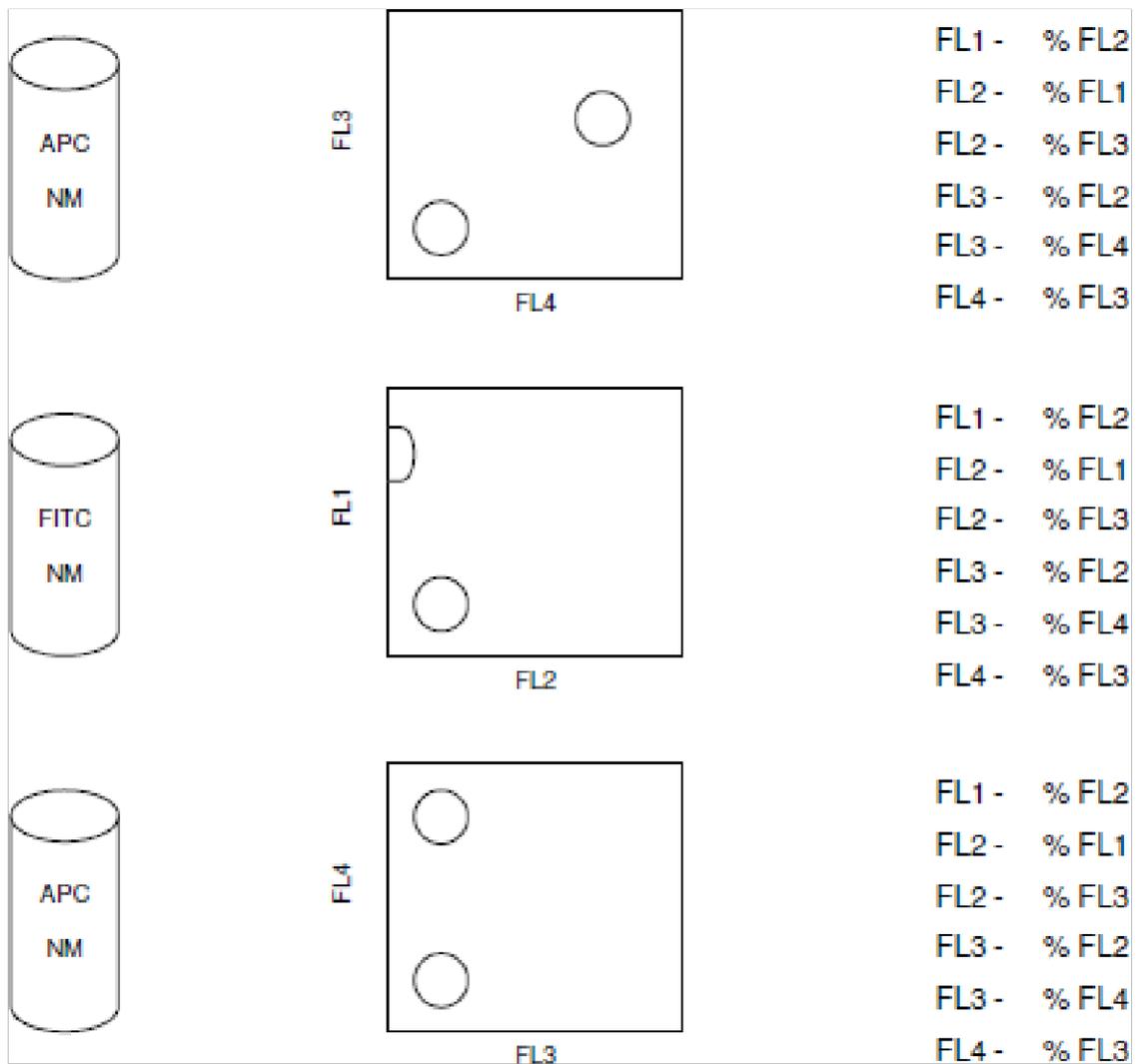


3. O que é a compensação? Por que é necessário realizar este procedimento?



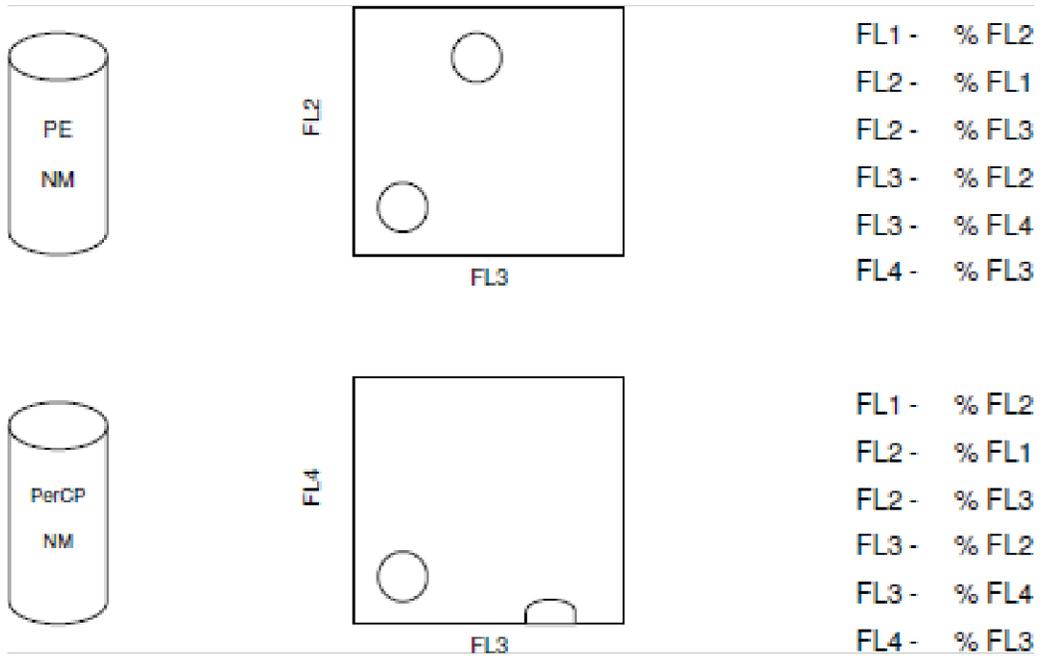
4. Observando o conteúdo dos tubos, como você faria a compensação nos gráficos abaixo? Indique a região-alvo das *beads* marcadas, bem como qual compensação seria realizada e se o valor deveria aumentar ou diminuir. Considere que o ajuste de voltagem dos PMTs já foi realizado.





Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™



PRÁTICA 1: CALIBRAÇÃO

Software BD FACSComp™

1. Preparar:
 - Tubo A: (1ml de solução BD FACSCFlow™ + 1 gota da partícula não marcada + 1 gota da partícula APC)
 - Tubo B: (3 ml de solução BD FACSCFlow™ + 1 gota da partícula não marcada + 1 gota da partícula FITC + 1 gota da partícula PE + 1 gota da partícula PerCP + 1 gota da partícula APC)
2. Abrir o software BD FACSComp™;
3. Adicionar o nome ou iniciais do operador na tela **Sign In**;
4. Clicar em **Accept**;
5. Clicar na opção **Lyse/No-Wash (LNW)** em **Assay Selection**. Verificar se as outras opções não estão selecionadas. Acrescentar o lote de identificação de cada partícula BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC no campo BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC Bead Lot IDs;
6. O **Target Value** do APC deve ser adicionado manualmente no software e muda de acordo com o lote dessa bead. Com o software BD FACSComp™ aberto clicar em BD FACSComp™ > Edit Target Value > OK Escolher o assay Lyse No Wash e em FL4 colocar o valor do Target Value que está na etiqueta ds bead APC.
7. Ajustar a vazão do fluxo em **HI** e apertar o botão **RUN** no citômetro;
8. Homogeneizar o tubo A e colocá-lo no citômetro;
9. Clicar em **Run** no menu do software e em seguida clicar em **Start** para iniciar a aquisição dos eventos. –
Realizar a primeira calibração de modo automático:
10. Após, repetir os passos de 2 a 8, porém, realizar a calibração com ajustes manuais: Clicar em **Manual** na parte inferior da tela para fazer o ajuste manualmente. A janela de valores alvos (**target values**) aparecerá. Utilizar a janela **Detectors/Amps** para ajustar os PMTs em ± 2 canais dos valores de referência para a fluorescência do PMT;
11. Após ajustar todos os detectores, clicar em **Time Delay** para que o software faça a verificação automaticamente;
12. Em seguida aparecerá a tela de ajuste da Compensação, retirar o tubo A e colocar o tubo B na probe. Clicar em **Start**;



13. Clicar em **Manual** na parte inferior da tela para fazer o ajuste de compensação manualmente. A janela de valores alvos (**target values**) aparecerá. Utilizar a janela de compensação para ajustar a compensação manualmente. As diferenças médias são mostradas embaixo dos gráficos. Estes valores devem ser menores que ± 2 canais em relação aos valores alvos;
14. Clicar em **Next** para dar início ao teste de sensibilidade. O software irá finalizar automaticamente os ajustes necessários;
15. Verificar o laudo da calibração, Clicar em **Set Up**. Na tela **Sign In**, clicar em **Quit**;
16. Realizar a Limpeza após aquisição;

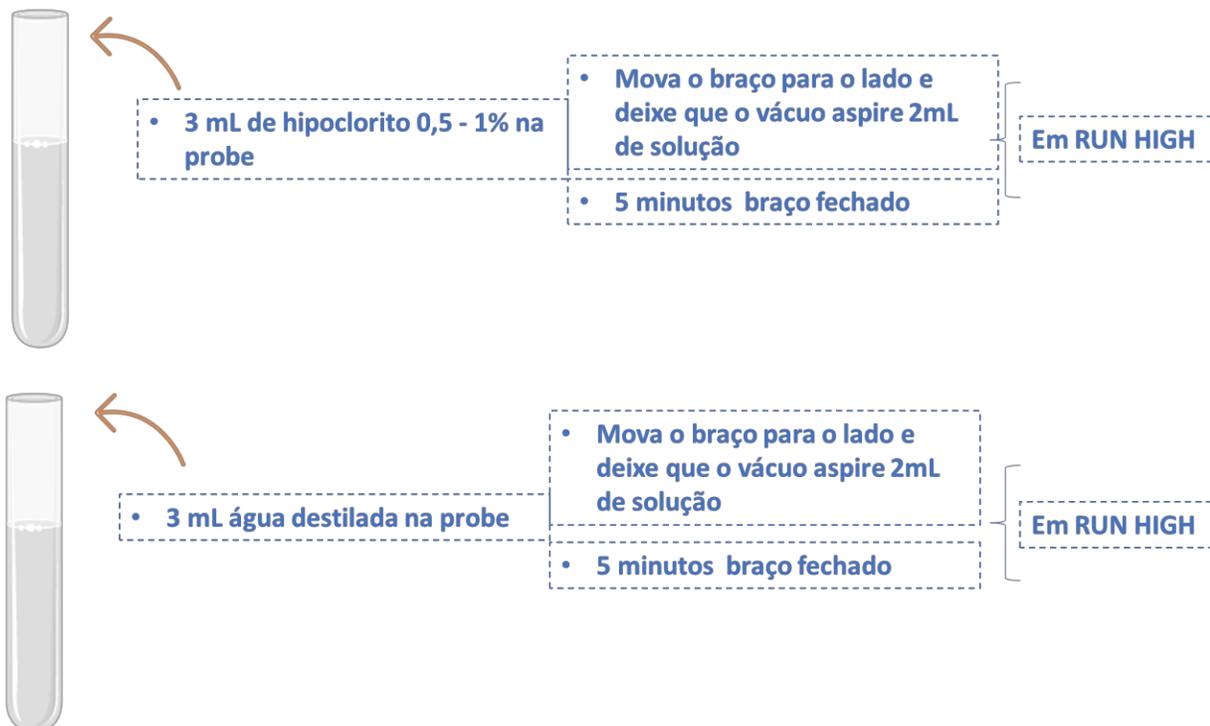


Figura 18: Limpeza após aquisição. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

EXERCÍCIOS

1. Quando deve ser realizada a limpeza após aquisição?

2. Qual é a função da Vedação Bal? Por que é necessário trocá-lo e qual deve ser a periodicidade desta troca?

3. Quais são os sinais de que a Vedação Bal deve ser trocada?



PREPARO DAS AMOSTRAS E CONTROLES

Todos os passos da etapa de preparo de amostras e controles devem ser respeitados à risca para que os resultados obtidos sejam fidedignos. É muito importante que os tempos e as condições de incubação, bem como os volumes de amostra, reagentes e soluções pipetadas sejam obedecidos.

O sangue deve ser coletado em tubos EDTA K₂ ou K₃. Após a coleta, o sangue deve ser utilizado para a preparação da amostra em até 48 horas, desde que este sangue tenha sido mantido em temperatura ambiente (20°C a 25°C). O protocolo que deve ser utilizado na preparação das amostras é o que foi preconizado pelo fabricante do reagente utilizado para a marcação das células (BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC).



- Utilizar pipetagem reversa para o sangue.
- A solução de lise diluída deve ser utilizada em até um mês desde que conservada em frasco de vidro limpo. Se for utilizado outro tipo de frasco, o ideal é que sejam feitas diluições semanais.

Figura 19: Preparo de amostra. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.



PRÁTICA 2: AMOSTRAS

Etapa 1- Adicionar o reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC aos BD Trucount™ Absolute Count Tubes™.

As amostras para quantificação de CD4/CD8 são processadas em tubos denominados BD Trucount™ Absolute Count Tubes. Nesses tubos, existe um grupo (*pellet*) de beads fluorescentes responsáveis por gerar as contagens celulares absolutas em cada amostra. Por isso, antes de se pipetar o BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC dentro dos tubos, é muito importante verificar a integridade do *pellet* de beads. O BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o reagente que contém uma mistura de anticorpos anti-CD3 conjugados ao FITC, anticorpos anti-CD8 conjugados ao PE, anticorpos anti-CD45 conjugados ao PerCP e anticorpos anti-CD4 conjugados ao APC. O BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC deve ser pipetado (20µL) nos *BD Trucount™ Absolute Count Tubes* com cuidado para que a ponteira não toque no *pellet* de beads. Quando o reagente toca as beads, elas são solubilizadas. *As informações contidas nessa seção podem ser encontradas na bula do BD Trucount™ Absolute Count Tubes e BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC.*

Etapa 2- Pipetar o sangue.

O volume de sangue utilizado é 50µL e deve ser pipetado por **pipetagem reversa** (pipetagem utilizada para líquidos viscosos). Antes da pipetagem do sangue, o tubo de amostra deve ser bem homogeneizado e isso pode ser feito manualmente, agitando o tubo dez vezes por inversão ou ainda mantendo o tubo em agitador automático, porém nesse caso, o tempo de agitação não deve ultrapassar 10 minutos. Após, a pipetagem do sangue, os tubos devem ser agitados em vórtex leve e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C) e sob o abrigo da luz. *As informações contidas nessa seção podem ser encontradas na bula do BD Trucount™ Absolute Count Tubes e BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC.*

Etapa 3- Lise das hemácias e fixação das marcações de superfície

Após os 15 minutos de incubação, 450µL da solução de lise (FACS BD FACS™ Lysing Solution Solution) já diluída 1:10 em água destilada deve ser adicionado ao tubo. A solução de lise (diluída ou concentrada) não requer proteção da luz nem refrigeração e, após diluída, deve ser utilizada em até um mês desde que conservada em frasco de vidro limpo ou polietileno de alta densidade. Depois deste procedimento, o tubo deve ser homogeneizado e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C) sob o abrigo da luz. *As informações contidas nessa seção podem ser encontradas na bula do reagente BD FACS™ Lysing Solution.*

Etapa 4- Leitura no BD FACSCalibur™.

Após o preparo completo, as amostras podem ser lidas em até 24 horas, **desde que tenham sido mantidas no escuro e à temperatura ambiente (20°C a 25°C).**



PRÁTICA 3: CONTROLES

Os controles podem ser preparados com sangue de pacientes saudáveis ou pacientes HIV positivos que tenham celularidade mínima de linfócitos TCD4 (≥ 500 células/uL) e atenderem aos pré-requisitos de uma amostra em boa qualidade. Assim como para as amostras, o sangue para preparo dos controles deve ser utilizado no máximo após 48 horas da coleta, **desde que este sangue tenha sido mantido em temperatura ambiente (20°C a 25°C) e sem agitação.**

Os BD Trucount™ Control Beads monitoram o funcionamento correto dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes e avaliam a pipetagem do operador responsável pelo preparo das amostras. Para tanto, são utilizadas *beads* em alta, média e em baixa concentração (valor absoluto conhecido em 50µL de cada controle). Por esta razão, os controles são preparados em três tubos: o controle alto (ou *high*), o controle médio (ou *medium*) e o controle baixo (ou *low*).

O preparo dos controles é muito similar ao das amostras, mas com um último passo a mais. As 3 etapas de preparação de amostra são aplicáveis à preparação dos controles e após a incubação com a solução de lise diluída, é acrescentado aos respectivos tubos de cada controle 50µL das *beads* correspondentes (pipetagem reversa). Antes da pipetagem, os frascos dos BD Trucount™ Control Beads devem ser vortexados gentilmente por 30 segundos. Após, a adição dos controles aos tubos, os mesmos já podem ser adquiridos no citômetro imediatamente ou em no máximo 24 horas.

Antes da leitura de controles ou amostras, os tubos devem ser homogeneizados. A aquisição dos controles deve ser realizada em todos os dias em que o laboratório tiver rotina CD4/CD8 e os mesmos devem ser analisados utilizando-se as Regras de Westgard.

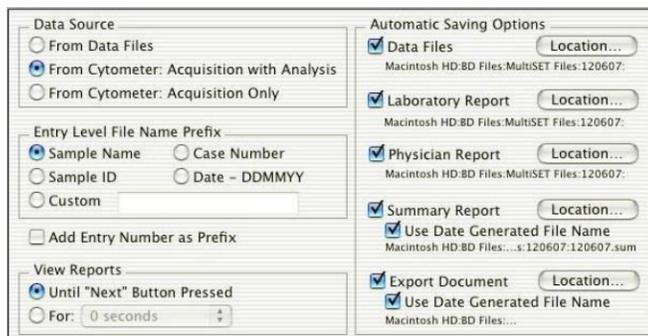
As informações contidas nessa seção podem ser encontradas na bula do BD Trucount™ Absolute Count Tubes, BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC e BD Trucount™ Control Beads.



PRÁTICA 4: BD MULTISSET™ E AQUISIÇÃO DE AMOSTRAS

Tela 1. Setup do Software BD Multiset™

Após preencher com o nome ou iniciais do operador, clicar em **Accept**. A tela **Set Up** irá aparecer. Verificar as seguintes seleções na tela **Set Up**.



Tela Set Up do Software BD Multiset™

Modos de aquisição e análise dos dados:

A) From Cytometer: Acquisition with Analysis: para processar amostras e analisá-las automaticamente após a aquisição.

- ✓ Clicar **Accept** na tela **Set Up**. A janela **BD FACSComp™** irá aparecer.

Para calibrar o equipamento, clicar em **Launch BD FACSComp™** e no final da calibração, clicar em **SET UP**.



Tela 2. Test Preferences

- ✓ Verificar se os parâmetros corretos estão selecionados na janela **Test Prefs** (todas as opções que dizem respeito à rotina CD4/CD8 selecionadas).

The screenshot shows the 'Physicians Report Choices' section with the following options checked:

- CD3+CD4+ %T Lymph
- CD3+CD8+ %T Lymph
- CD3+CD4+CD8+ %T Lymph
- CD3+ %Lymph
- CD3+ Abs Cnt
- CD3+CD4+ %Lymph
- CD3+CD4+ Abs Cnt
- CD3+CD8+ %Lymph

The 'Report Reference Ranges' section has the following options checked:

- Report Reference Ranges
- QC Message for Out of Normal Range

The 'Laboratory Report Choices' section has the following options checked:

- Report Percents
- Report Absolute Counts

The 'Summary Report ID' section has the following options checked:

- Sample Name
- Sample ID
- Case Number

Tela Test Prefs.

- ✓ Clicar em **Lot IDs**.

Atualizar o lote do BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC em **Reagent Lot ID**

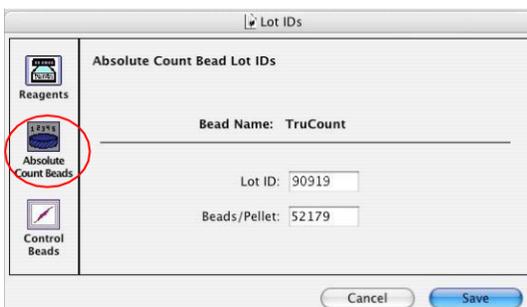
The screenshot shows the 'Lot IDs' window with a table of reagent lot IDs. The 'Reagents' icon in the left sidebar is circled in red.

Reagent Name	Lot ID
CD4 / CD8 / CD3	00000
CD3 / CD4 / CD45	00000
CD3 / CD8 / CD45	00000
CD3 / CD19 / CD45	00000
CD3 / CD16+56 / CD45	00000
CD3 / CD8 / CD45 / CD4	00481
CD3 / CD16+56 / CD45 / CD19	00000

Tela Reagents no ícone Lot IDs.

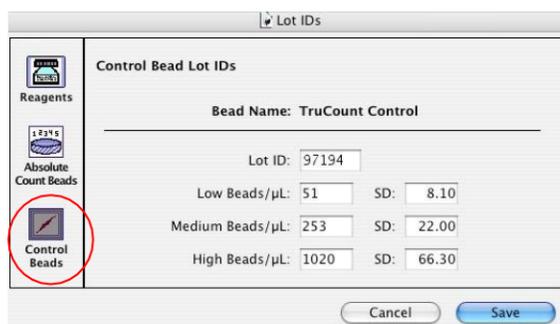


- ✓ Atualizar as informações de **Absolute Count Beads** e adicionar os valores de **lot ID** e **beads/pellet** presentes na etiqueta da embalagem metálica contendo BD Trucount™ Absolute Count Tubes.



Tela Absolute Count *Beads* no ícone Lot IDs.

- ✓ Atualizar as informações de **Control Beads**: número de *beads* e o desvio padrão (SD) de cada um dos níveis de partículas BD Trucount™ Control Beads. Estes números estão descritos na caixa do BD Trucount™ Control Beads.



Tela Control *Beads* no ícone Lot IDs.

- ✓ Clicar em **Save**



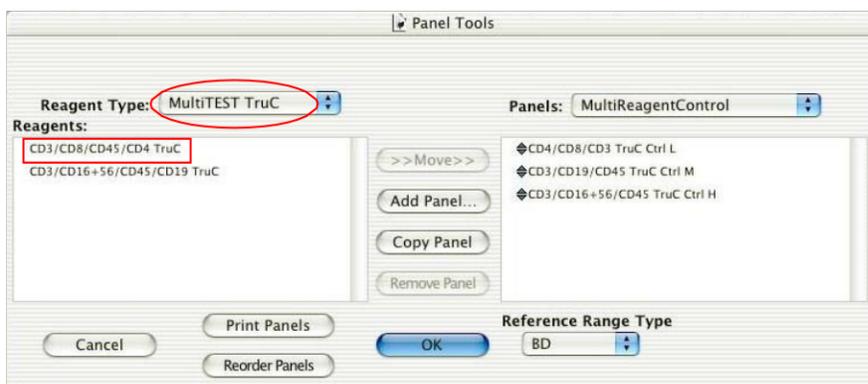
Tela 3. Preenchendo as Informações Sobre as Amostras e Painéis

- ✓ Clicar em **Accept** para continuar na janela de amostras.

Criando os painéis da rotina

Uma vez que um painel é criado, o mesmo ficará gravado no software e não haverá a necessidade de criá-lo novamente.

- 1 Selecionar **Tools > Panel Tools**.
- 2 Selecionar **BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC TruC** no menu **Reagent Type** no lado esquerdo da tela e selecionar **CD3/CD8/CD45/CD4 TruC** na lista abaixo deste menu.

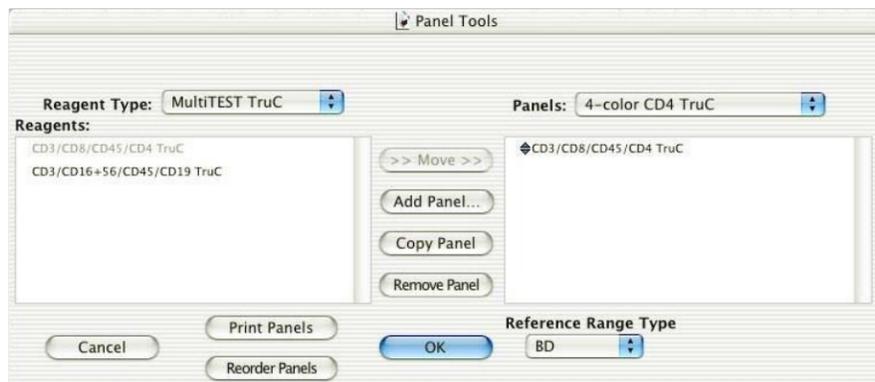


- 3 Clicar em **Add Panel** e nomear o painel com **nome do seu grupo**. (no exemplo temos 4-color CD4 TruC)



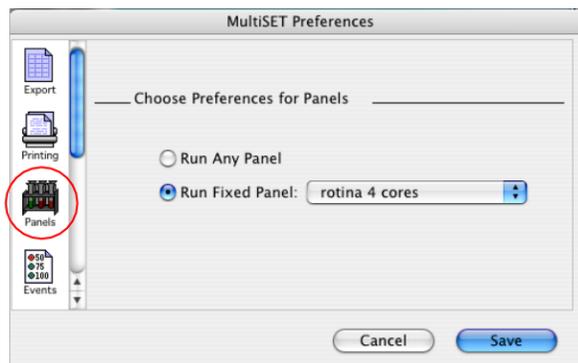
- 4 Selecionar um reagente da lista de Reagentes, clicar em **Move** e em seguida clicar em **OK**.





Fixando o Painel

1 Para fixar o painel, selecionar **BD Multiset™ > Preferences > Panels**. Clicar em **Run Fixed Panel** e selecionar o painel que você criou. Mesmo quando o painel é fixo, é possível modificar o painel para uma determinada amostra na coluna **Panel Name**. Por exemplo, pode-se fixar o painel Rotina 4 cores e alterar o painel apenas para as amostras do controle baixo, médio e alto do BD Trucount™ Control Beads.



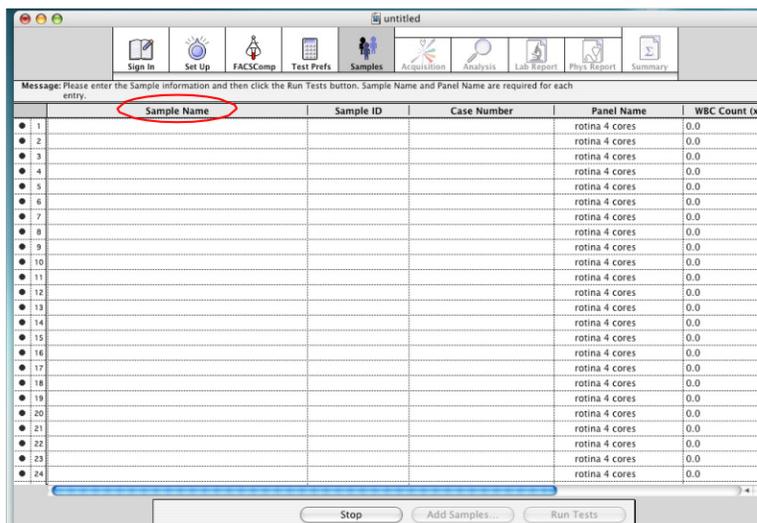
Tela Panels em BD Multiset™ Preferences.

Preparação para a aquisição: Preenchendo a lista de amostras

1 Clicar no campo **Sample Name** e adicionar um nome para o controle. Clicar na coluna **Panel Name** e selecionar o painel **CD3/CD8/CD45/CD4 Control**.



2 Digitar as amostras dos pacientes: Geralmente no laboratório, o painel utilizado para o reagente CD3 /CD8/CD45/CD4 com os BD Trucount™ Absolute Count Tubes é o ROTINA 4 CORES. Mas procure o painel que você criou e o seleccione.



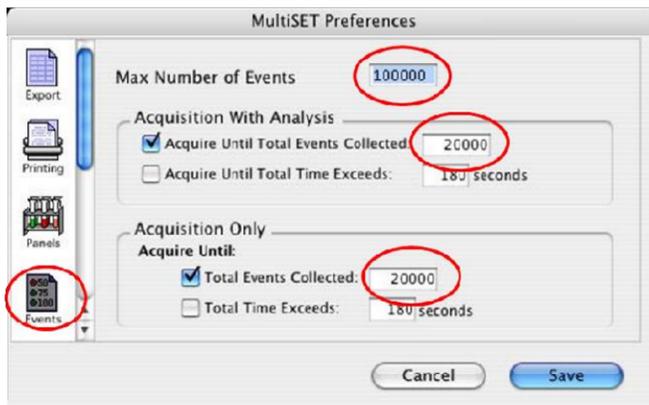
Tela Samples.

- 3 Após digitar sua lista, salve em: **File > Save as**
- 4 Seleccione o drive **FACStation > pasta BD Files > BD Multiset™ files > Pasta do dia**
- 5 Nomear o arquivo e clicar em **Save**.

Preparação para a aquisição: Determinando o número de eventos a serem coletados

- 1 Deve-se adquirir no mínimo 2.000 eventos de linfócitos totais em um total de 20.000 eventos. Caso não seja adquirido 2.000 eventos de linfócitos totais após a aquisição de 20.000 eventos, o software BD Multiset™ continua adquirindo até atingir o máximo de 100.000 eventos.
- 2 O número total de eventos a serem adquiridos (20.000 eventos) e o número máximo (100.000 eventos) estão determinados em **BD Multiset™ > Preferences > Events**. Deixar seleccionada a opção **Acquire Until Total Events Collected: 20.000**.

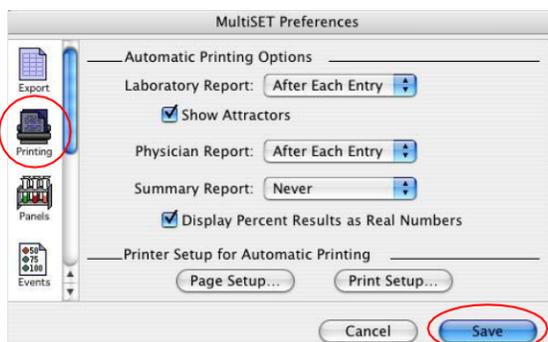




Tela Events em BD Multiset™ Preferences.

Preparação para a aquisição: Configurando os laudos que serão impressos

1 Para habilitar ou desabilitar a impressão do laudo, procurar na barra **BD Multiset™** superior e clicar na seqüência: **Preferences > Printing > Never** (para desabilitar a impressão) ou **After each entry** (para habilitar a impressão após cada análise) > **Save** (Figura 9).



Configuração da impressora para habilitar ou não a impressão dos laudos.



Aquisição das amostras

1 Agitar as amostras para ressuspender antes de passá-las no citômetro de fluxo.

✓ Verificar se os botões RUN e HI estão selecionados no painel de controle.

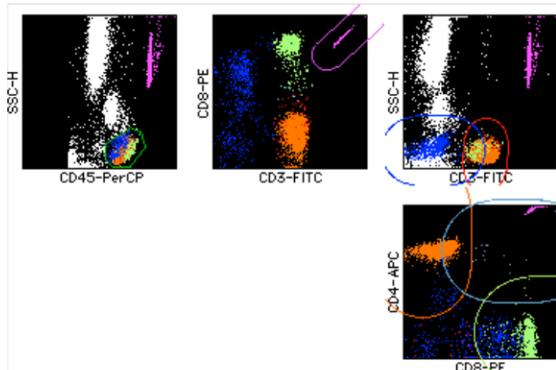
✓ Clicar em Run Tests.

✓ Aguardar até que eventos cheguem completamente até o feixe de laser

✓ Clicar em Acquire. A fase de aquisição é iniciada.

2 Quando a aquisição é finalizada, remover o tubo do citômetro. Em seguida, aparecerá o **Laboratory Report**.

3 Avaliar os gráficos e as contagens. As posições dos gates e populações celulares devem aparecer de forma semelhante ao gráfico a seguir.



Gráficos apresentados no Laboratory Report.

4 Clicarem **Continue** e prosseguir com as aquisições.

5 Todos os gráficos devem ser inspecionados.

6 Quando a última amostra for analisada, aparecerá a janela do **Summary Report**. O laudo **Summary Report** contém uma lista de todas as amostras no **Schedule document**. Os campos desta janela não podem ser editados.

7 Após a aquisição da última amostra, clicar em **Quit** para sair do software BD Multiset™.

8 Realizar o procedimento de **limpeza após aquisição** para proceder o desligamento do citômetro de fluxo BD FACSCalibur.



As informações contidas nessa seção podem ser encontradas na bula do BD Trucount™ Absolute Count Tubes e BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC e Capítulo 5: Processar amostras manualmente, das Instruções de Uso.

C) Fase Pós Analítica

1. Interpretação de resultados

1.a Amostras

Após a leitura de cada amostra, o BD Multiset™ gera dois laudos: o **Lab Report** e o **Physician Report**.

O **Lab Report** é o laudo onde os gráficos contendo as populações celulares estão presentes. Os valores percentuais e absolutos são provenientes de cada gráfico do laudo. Por isso, observar se as populações estão devidamente distribuídas nesse laudo é de extrema importância. Além disso, o número de eventos de linfócitos e de beads deve atingir valores mínimos:

- **Linfócitos** ≥ 2000

- **Beads** ≥ 500

A análise de consistência dos resultados (referência 9 descrita no capítulo final desse documento) também deve ser realizada:

- **Pureza do gate de linfócitos (CD45 x SSC)**

- **Soma de LT CD4+ e LTCD8+ = CD3 +/- 10%**

✓ **Se maior que CD3 – Avaliar presença de LTDP**

✓ **Se menor que CD3 – Avaliar presença de LT $\gamma\delta$**

O **Physician Report** é laudo onde os valores percentuais e absolutos da amostra são mostrados em comparação a um intervalo de referência estabelecido para a população norte-americana saudável, por isso é bem comum os resultados dos pacientes não se encaixarem nesse intervalo.

O BD Multiset™ é capaz de mostrar a localização da mesma população celular em gráficos diferentes, o que permite determinar a combinação de marcadores daquele grupo de células, tornando possível sua fenotipagem. A maneira como o software faz isso é colorindo as populações com diferentes cores, que nada têm a ver com as cores das fluorescências emitidas pelos fluorocromos. Assim, a população de cor verde no gráfico CD8xCD4 é exatamente a mesma população verde que aparece no gráfico CD3xSSC, que é exatamente a mesma população verde mostrada no gráfico CD3xCD8, que é exatamente a mesma população verde vista no gráfico CD45xSSC. O mesmo raciocínio vale para as demais cores (azul, laranja, rosa, amarelo). Veja a figura 20



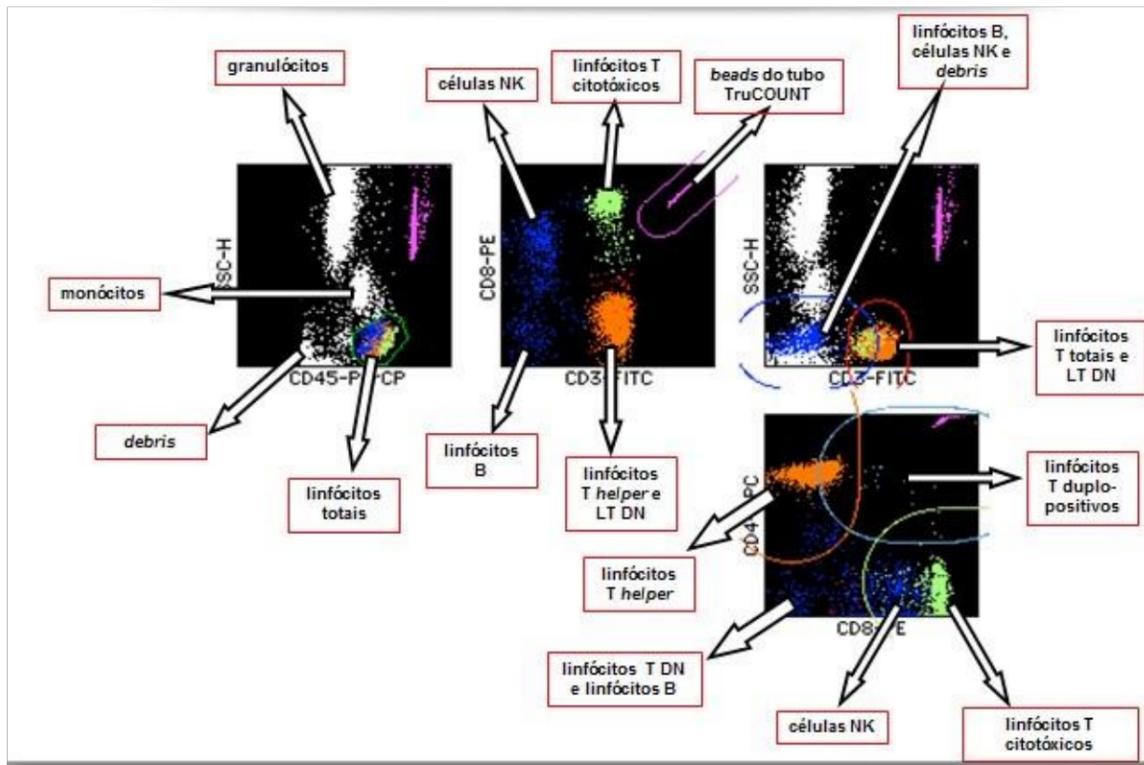


Figura 20: Populações celulares – BD Multiset™.

O objetivo do BD Multiset™ é diferenciar os linfócitos das demais células:

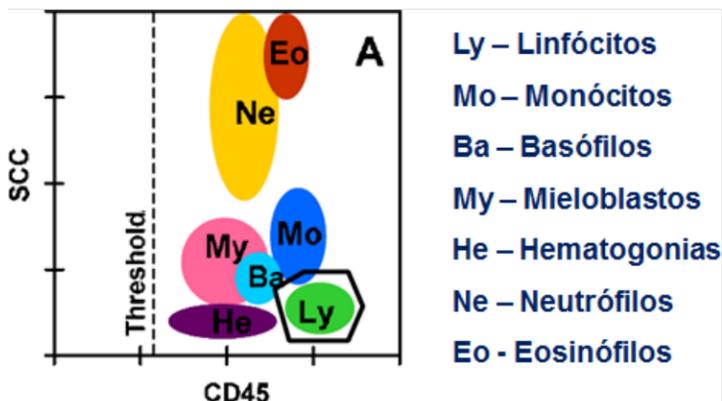


Figura 21: Diferenciação dos linfócitos

a) Gates e Attractors

O software BD Multiset™ foi desenvolvido de maneira a gerar automaticamente valores de contagens celulares através da combinação de *gates/attractors* desenhados também de forma automática pelo software. O gate feito na população de linfócitos no gráfico CD45xSSC é chamado de *Expert Gate* e é desenhado pelo software utilizando como base uma região chamada de *valley* que existe entre linfócitos e monócitos. Veja a figura abaixo:

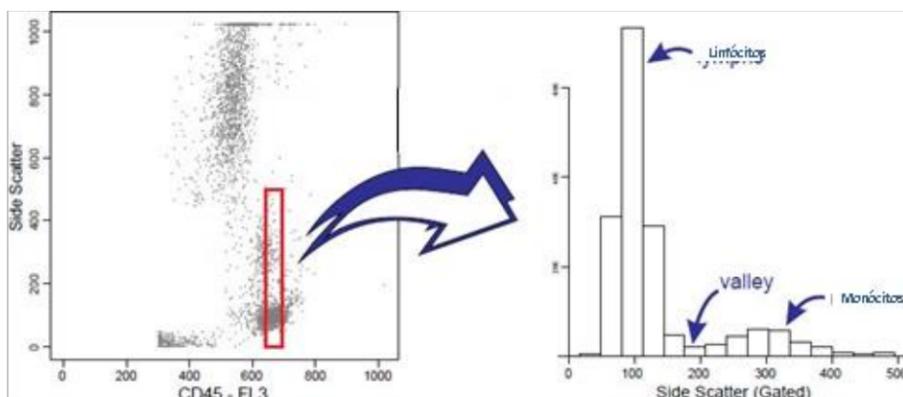


Figura 22: Desenho do *Expert Gate*.



Depois desse primeiro ajuste nos gráficos de fluorescência, são circundadas as subpopulações de linfócitos, que se auto ajustam de acordo com as variações populacionais encontradas entre as amostras.

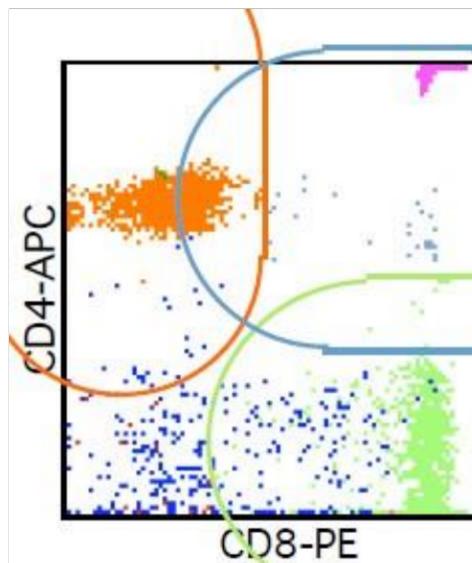


Figura 23: *Attractos* BD Multiset™



b) Estratégia utilizada - BD Multiset™

CD3/CD8/CD45/CD4	
Bead	FL1 vs FL2 (ungated)
Control Bead	FL1 vs FL2 (ungated)
Lymph	FL3 vs SSC (ungated)
CD3 ⁺	FL1 vs SSC (gated)
CD3 ⁺ CD4 ⁺	FL2 vs FL4 (gated)
CD3 ⁺ CD8 ⁺	FL2 vs FL4 (gated)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	FL2 vs FL4 (gated)
CD3 ⁻	FL1 vs SSC (gated)

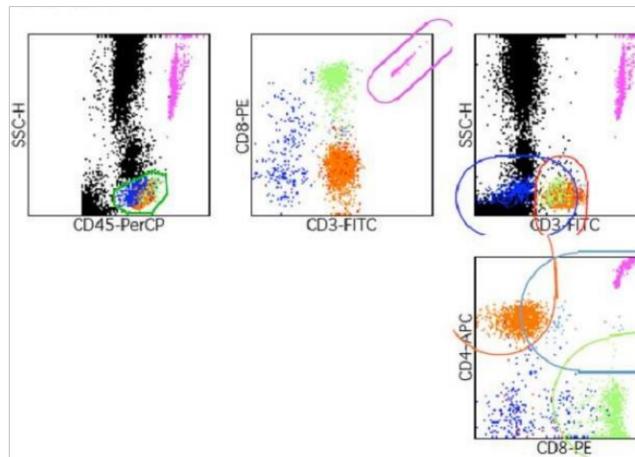


Figura 24: Estratégia de gate BD Multiset™.

O BD Multiset™ gera valores celulares em números de eventos, valores percentais (%Lymph) e absolutos (Abs Cnt), sendo que para esse último é necessária a utilização dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes no preparo darotina.

Lymph Events	3645
Read Events	1176
CD3+ %Lymph	69
CD3+ Abs Cnt	2174
CD3+CD8+ %Lymph	27
CD3+CD8+ Abs Cnt	853
CD3+CD4+ %Lymph	39
CD3+CD4+ Abs Cnt	1232
CD3+CD4+CD8+ %Lymph	1
CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt	38
CD45+ Abs Cnt	3165
T H/S Ratio	1.45

Figura 25: Contagens celulares – Lab Report – BD Multiset™.

Os valores percentuais são gerados com base no número de eventos de linfócitos e de cada população de interesse. Uma vez que a população foi identificada pelo *attractor*, o número de eventos existente naquela região é compilado, o valor é dividido pelo número de eventos de linfócitos (Lymph Events) e multiplicado por 100.

$$\% \text{ de células} = \frac{\text{Número de eventos dentro da região de interesse} \times 100}{\text{Número de eventos de linfócitos (Lymph Events)}}$$

Sendo assim, o valor de CD3+%Lymph corresponde à porcentagem de linfócitos T existente dentre todos os linfócitos da amostra.

Já os valores absolutos (células/ μ L) são gerados com o auxílio dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes. Isso porque para ter acesso a esse valor é necessário encontrar o volume de sangue que foi utilizado pelo citômetro para gerar todas as contagens absolutas. Para se descobrir o volume de sangue, o software realiza um cálculo como ilustrado abaixo:



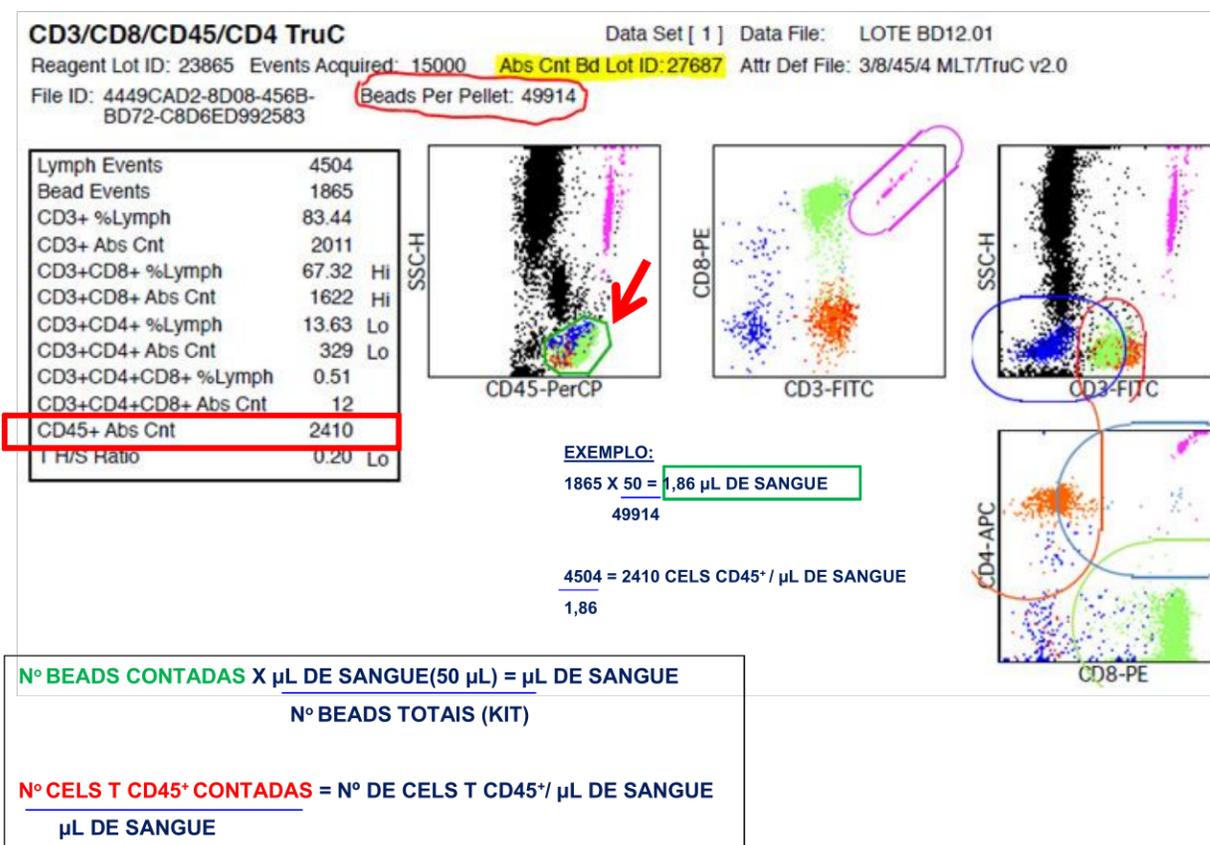


Figura 26: Contagens Absolutas – Lab Report – BD Multiset™.

Assim, o valor de CD4+ Abs Cnt corresponde ao número de linfócitos T helper por microlitro de sangue daquele paciente e assim funciona para todas as outras populações celulares para as quais os valores absolutos são gerados (CD3+ Abs Cnt, CD3+CD8+ Abs Cnt, CD3+CD4+ Abs Cnt, CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt e CD45+ Abs Cnt).

Dentro do quadro de valores gerados pelo BD Multiset™ é ainda possível encontrar a relação entre linfócitos T helper e linfócitos T citotóxicos, antigamente chamados de linfócitos T supressores. A representação dessa relação é **T H/S ratio**. A razão H/S ou CD4/CD8 é obtida pela divisão do número de eventos da população de

linfócitos T *helper* pelo número de eventos da população de linfócitos T citotóxicos. Se a contagem absoluta ou a contagem percentual de linfócitos T *helper* for dividida pelos mesmo valores de linfócitos T citotóxicos, o resultado será idêntico.

Há, porém, dois fatores cruciais para que todas essas contagens sejam confiáveis: o número de eventos de linfócitos (*Lymph Events*) que deve ser igual ou maior que 2000 e o número de eventos de *beads* (*Bead Events*) que deve ser maior ou igual a 500.

1.b Controles

A interpretação dos resultados dos controles é muito similar à dos resultados das amostras. Assim como para as amostras, é necessário verificar se os números mínimos de eventos de linfócitos e de eventos de *beads* foram atingidos, bem como se as populações celulares estão distribuídas de maneira correta nos gráficos.

A diferença é que nos gráficos dos controles aparece um grupo de eventos amarelos, que representam as *beads* BD Trucount™ Control Beads.

O valor de **Control Bead Events** indica o número de eventos de *beads* BD Trucount™ Control Beads. O BD Multiset™ divide este valor pelo volume de sangue calculado anteriormente e gera, então, a contagem absoluta de *beads* de controle (**Control Bead Abs Cnt**). Na interpretação desses dados, o que deve ser feito é a comparação entre o valor de *Control Bead Abs Cnt* com os valores fornecidos pelo fabricante (esses valores estão na caixa dos BD Trucount™ Control Beads), levando em consideração seu desvio padrão (representado por SD nos gráficos e na caixa do reagente).



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8 BD FACSCalibur™

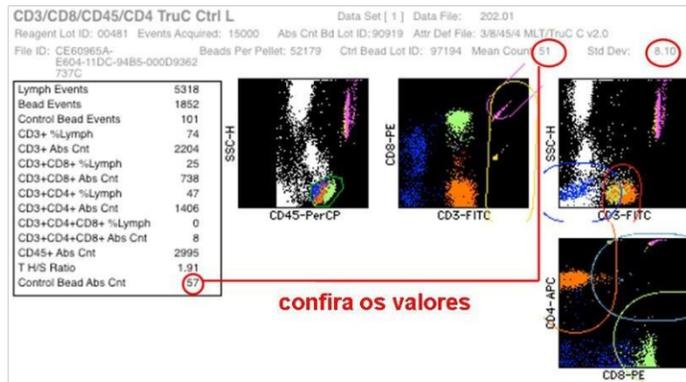


Figura 27: Visualização do Controle baixo (*Low*).

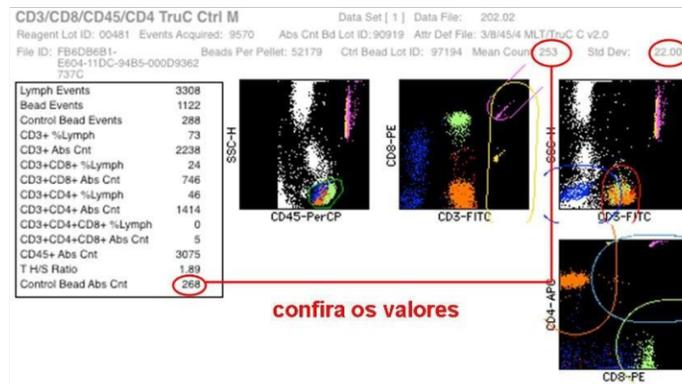


Figura 28: Visualização do Controle médio (*Medium*).



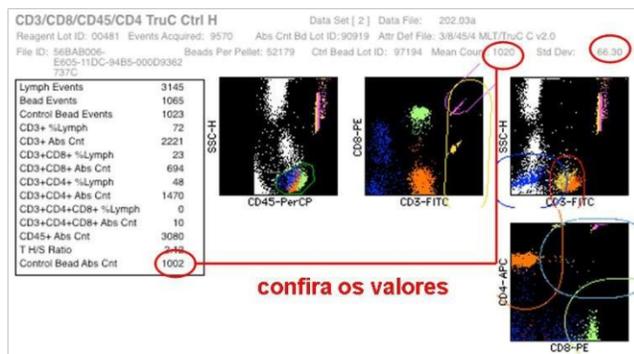


Figura 29: Visualização do Controle alto (High).

Como a contagem absoluta correta de cada controle é conhecida, um resultado fora do intervalo esperado ($\pm 1SD$) indica a reprovação do controle em questão no teste, porém se a rotina deverá ser descartada ou não, dependerá de uma análise mais detalhada de cada controle utilizando as regras de Westgard. A importância em se realizar os controles diariamente quando se tem rotina é que os mesmos ajudam a avaliar a pipetagem do operador e a identificar o tipo de erro que podem estar inserido na rotina (sistemático, aleatório, etc). As informações contidas nessa seção podem ser encontradas na bula do BD Trucount™ Absolute Count Tubes, BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC e BD Trucount™ Control Beads.

1.c Regras de Westgard na rotina CD4/CD8

No ano de 2008 o Departamento de DST, Aids e hepatites virais iniciou a implementação do sistema de avaliação e monitoramento da qualidade através de planilhas eletrônicas específicas para a construção de gráficos de Levey-Jennings e aplicação das regras de Westgard para interpretações e tomadas de ações corretivas quando necessárias. O programa disponibiliza no site do Ministério da Saúde (<http://www.aids.gov.br>) em Profissionais de saúde> Central de Conteúdo> Biblioteca> Planilhas. No campo de busca, digitar: cq-facscalibur-controle-de-qualidade.os arquivos para a construção dos gráficos de Levey-Jennings e as Regras de Westgard que devem ser utilizadas da seguinte maneira:

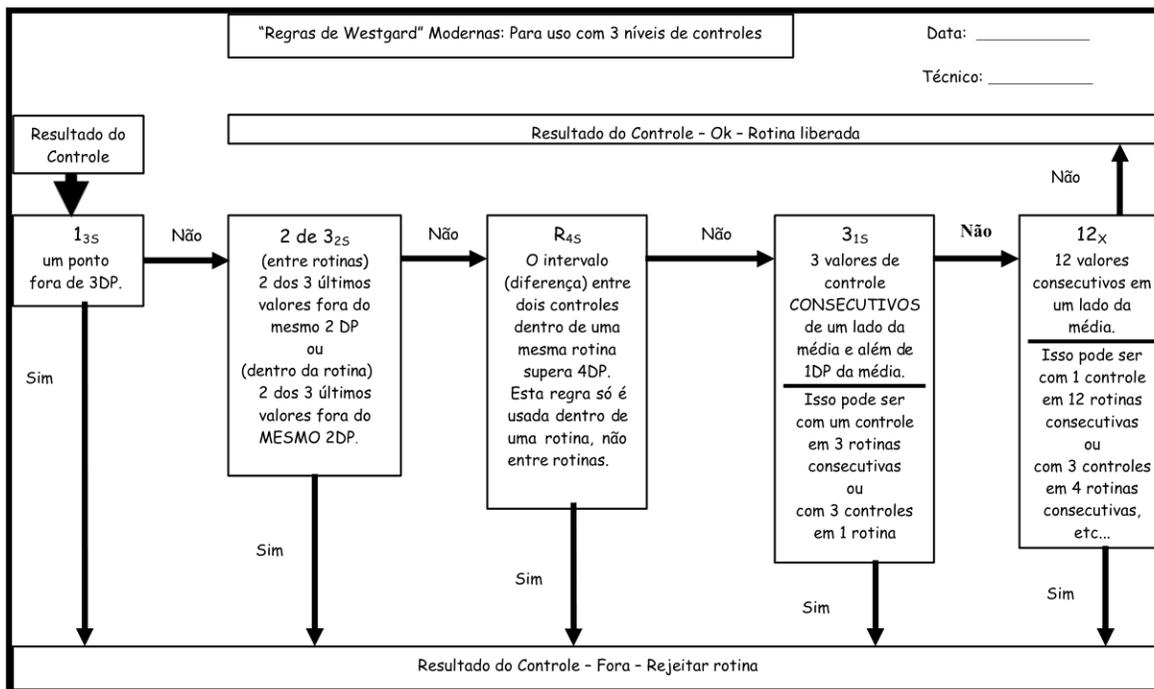
- ✓ Preencher o Mapa de trabalho de CQ com os dados obtidos dos valores das beads dos controles baixo, médio e alto obtidos;



- ✓ No arquivo em formato “Excel” – Planilha CQ BD FACSCalibur™ – do gráfico de Levey-Jennings, clicar em Não atualizar. As três primeiras colunas da esquerda para a direita, deverão ser preenchidas com a data de realização, o mês e o número do controle realizado. Nas três colunas seguintes, nesta mesma ordem, deverão ser introduzidos os valores Low, Medium e High das beads, obtidos após a passagem do BD Trucount™ Control Beads.
- ✓ As telas do lado direito de cada gráfico referentes ao BD Trucount™ Control Beads, deverão ser preenchidas com o número de lote e com os valores de média e desvio padrão informados na caixa do reagente.
- ✓ A medida que os valores de média e desvio padrão são preenchidos para cada nível de controle, as linhas do gráfico de Levey-Jennings são desenhadas e a medida que os valores dos controles forem sendodigitados, os respectivos gráficos serão construídos, momento em que deverão ser aplicadas as Regras de Westgard seguindo o fluxograma para a avaliação da rotina de trabalho.



1.d Fluxograma das Regras de Westgard



Nessa seção foi utilizada a referência 8, descrita no capítulo final desse documento.



Arquivos LJ Levey Jennings	Tipo: Procedimento Operacional Padrão Título: Utilização de arquivos LJ	Data: 11/10/2013
		Número: 01
		Revisão: A
		Páginas: 1 a 16

1. PROPOSTA

Este documento especifica o processo de utilização de arquivos LJ (BD Multiset™) na rotina de quantificação de linfócitos CD4/CD8, realizada pelos laboratórios que fazem parte da rede do Ministério da Saúde.

2. ESCOPO

O documento fornece as instruções necessárias para se:

- Realizar a análise automática dos Controles BD (BD Trucount™ Control Beads)



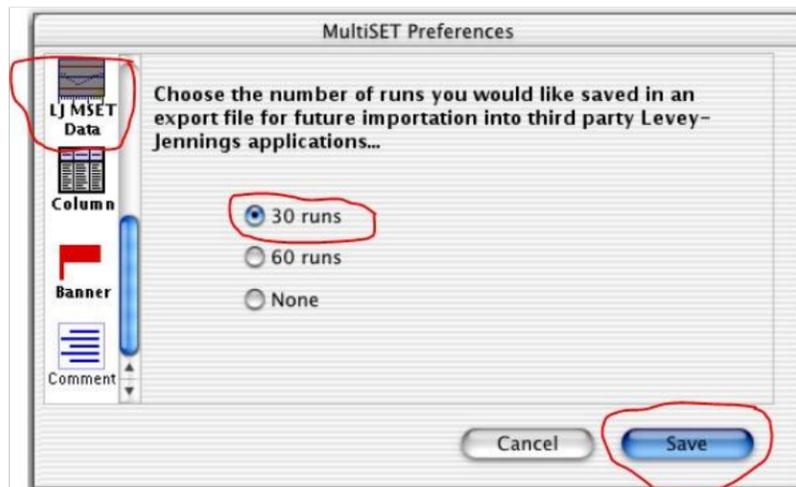
*É de inteira responsabilidade do laboratório, a interpretação dos resultados e a decisão das ações que devem ser tomadas em relação aos resultados dos BD Trucount™ Control Beads. Para tanto, deve ser utilizado o fluxograma das Regras de Westgard que está disponível no site do **Ministério da Saúde** (<http://www.aids.gov.br>) em **Profissionais de saúde > Central de Conteúdo > Biblioteca > Planilhas**. No campo de busca, digitar: **cq-facscalibur-controle-de-qualidade**.*

3. Análise dos BD Trucount™ Control Beads

Alternativamente a utilização da planilha atual onde os valores dos BD Trucount™ Control Beads são inseridos manualmente, a análise dos BD Trucount™ Control Beads, pode ser utilizada através da utilização do arquivo **LJ MSET QC** que o software BD Multiset™ cria automaticamente. Nesse arquivo, estão os resultados dos controles (beads) que podem ser exportados para gráficos de Levey-Jennings. O arquivo pode conter resultados de 30 ou 60 controles.



No menu BD Multiset™ escolha **Preferences** e então clique no ícone **LJ MSET Data** selecionando 30 runs. Como mostra a figura abaixo:



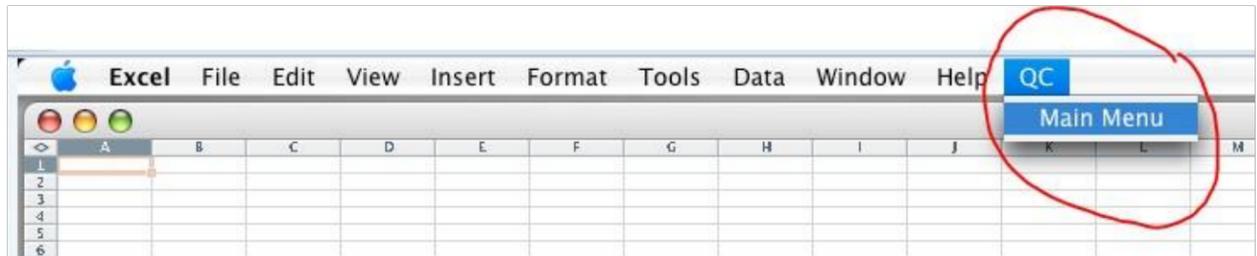
- Clique em **Save**.
- Quando você quiser gerar o arquivo de análise dos BD Trucount™ Control Beads, com o MutiSET fechado, clique em **FACStation > BD Files > BD Multiset™ Folder** e abra o arquivo **LJ MSET QC** clicando duas vezes nele.
- Automaticamente se abre uma janela onde se deve selecionar **Enable Macros**.



- Pressionar **Ok** na janela de **Disclaimer**.



- Na barra de ferramentas selecionar **QC** e **Main Menu**.



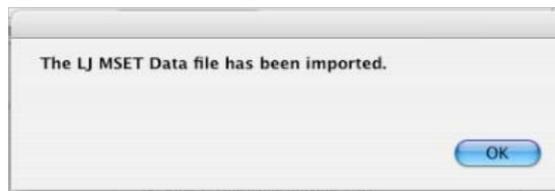
- Na janela Main Menu selecionar:
 - ✓ Number of Runs: 30 Runs
 - ✓ Westgard Rules: deixar tudo selecionado



- Pressionar **Import Data**, onde se abre uma janela de localização do arquivo LJ. O mesmo pode ser encontrado no diretório:

FACStation > BD Files > BD Multiset™ Files > LJ MSET Data

- Uma vez aberto, aparecerá uma janela de 3 passos, clicar em:
 - a. *Next*
 - b. *Next*
 - c. Column Data Format: **DATE**, e depois **Finish**
- 2. Aparecerá um aviso que o arquivo foi importado com sucesso.



3. Na janela Main Menu clicar em **QC Data**. Aparecerá uma mensagem dizendo: **QC Completed**. Clicar em OK.
4. Na sequencia clicar em **View Reports**.
5. Verificar se os dados importados estão corretamente distribuídos.
6. Para finalizar, guardar uma cópia do Excel com os arquivos importados clicando em **Save as**:
 - a. Diretório: Data > Programa HIV > Estatísticas > BD Trucount™ Control Beads
 - b. File Name: nome de escolha (ex: "QC Mar-Abr 13.xls)



4. Interpretando o arquivo final

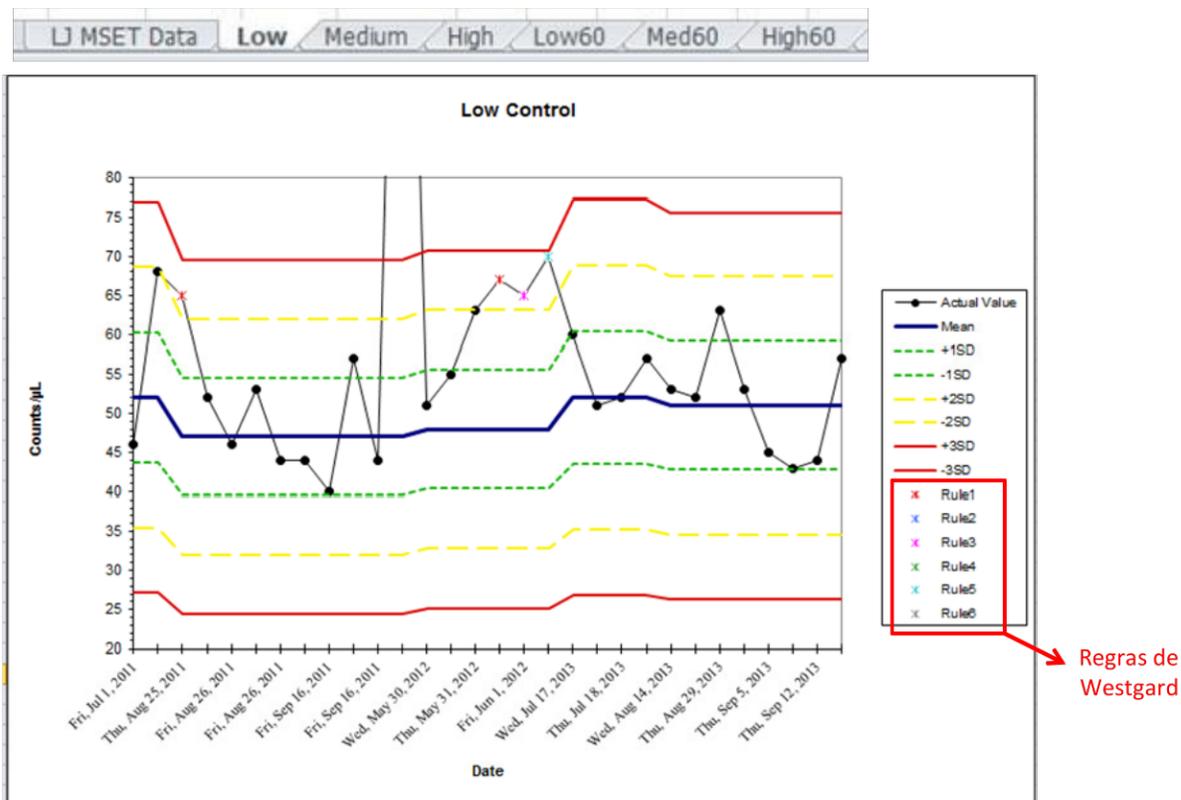
- Aba LJ MSET Data

LJ MSET Data	Low	Medium	High	Low60	Med60	High60	Main Menu
--------------	-----	--------	------	-------	-------	--------	-----------

Run Date	Run Time	Input Lot ID	Mean Count (Mean Count (Mean Count	Standard Dev Standard Dev Standard Dev	Measured Ctr Measured Ctr Measured Ctr	Bd Count (high)
Fri, Jul 1, 20	11:41 AM	65059	52 261 1058	8,3 22,7 68,8	46 227 909	
Fri, Jul 1, 201	11:43 AM	65059	52 261 1058	8,3 22,7 68,8	68 207 996	
Thu, Aug 25,	10:13 AM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	65 218 1033	
Thu, Aug 25,	10:40 AM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	52 235 869	
Fri, Aug 26, 2	9:40 AM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	46 237 929	
Fri, Aug 26, 2	9:44 AM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	53 258 1004	
Fri, Aug 26, 2	11:47 AM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	44 215 951	
Thu, Sep 15,	12:05 PM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	44 254 956	
Fri, Sep 16, 2	9:31 AM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	40 240 878	
Fri, Sep 16, 2	9:34 AM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	57 282 909	
Fri, Sep 16, 2	12:03 PM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	44 244 1008	
Fri, Sep 16, 2	12:07 PM	84306	47 240 963	7,5 20,9 62,6	162 247 1022	
Wed, May 30	4:16 PM	20968	48 243 977	7,6 21,1 63,5	51 237 1026	
Thu, May 31,	12:23 PM	20968	48 243 977	7,6 21,1 63,5	55 252 898	
Thu, May 31,	12:33 PM	20968	48 243 977	7,6 21,1 63,5	63 264 887	
Fri, Jun 1, 20	9:59 AM	20968	48 243 977	7,6 21,1 63,5	67 314 1488	
Fri, Jun 1, 20	10:02 AM	20968	48 243 977	7,6 21,1 63,5	65 364 1629	
Fri, Jun 1, 20	10:08 AM	20968	48 243 977	7,6 21,1 63,5	70 281 1483	
Wed, Jul 17,	1:02 PM	59731	52 259 1048	8,4 22,5 68,1	60 274 1060	
Thu, Jul 18, 2	10:12 AM	59731	52 259 1048	8,4 22,5 68,1	51 272 1085	
Thu, Jul 18, 2	10:43 AM	59731	52 259 1048	8,4 22,5 68,1	52 267 1029	
Thu, Aug 8, 2	6:31 PM	59731	52 259 1048	8,4 22,5 68,1	57 274 936	
Wed, Aug 14	1:05 PM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	53 253 1012	
Fri, Aug 16, 2	11:36 AM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	52 243 1081	
Thu, Aug 29,	11:38 AM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	63 289 1193	
Fri, Aug 30, 2	9:37 AM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	53 277 1153	
Thu, Sep 5, 2	2:46 PM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	45 289 1117	
Fri, Sep 6, 20	8:46 AM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	43 264 1119	
Thu, Sep 12,	2:21 PM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	44 245 1022	
Fri, Sep 13, 2	9:53 AM	72959	51 260 1040	8,2 22,6 67,6	57 309 1067	



- Aba LOW/Medium/High



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™

DIAS DA SEMANA	
INGLÊS	PORTUGUÊS
Monday (Mon)	Segunda-feira
Tuesday (Tues)	Terça-feira
Wednesday (Wed)	Quarta-Feira
Thursday (Thu)	Quinta-feira
Friday (Fri)	Sexta-feira
Saturday (Sat)	Sábado
Sunday (Sun)	Domingo



Abas utilizadas somente se for acompanhar 60 corridas.



- Regras de Westgard

O software mostra os valores que quebraram as regras de Westgard.

Date	Low Control									Westgard Rule Violations					
	Mean	SD	-1SD	+1SD	-2SD	+2SD	-3SD	+3SD	Actual Value	Rule1	Rule2	Rule3	Rule4	Rule5	Rule6
Fri, Jul 1, 2011	52	8	44	60	35,4	68,6	27,1	76,9	46						
Fri, Jul 1, 2011	52	8	44	60	35,4	68,6	27,1	76,9	68						
Thu, Aug 25, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	65	65					
Thu, Aug 25, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	52						
Fri, Aug 26, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	46						
Fri, Aug 26, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	53						
Fri, Aug 26, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	44						
Thu, Sep 15, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	44						
Fri, Sep 16, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	40						
Fri, Sep 16, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	57						
Fri, Sep 16, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	44						
Fri, Sep 16, 2011	47	8	40	55	32	62	24,5	69,5	162	162	162				
Wed, May 30, 2012	48	8	40	56	32,8	63,2	25,2	70,8	51						
Thu, May 31, 2012	48	8	40	56	32,8	63,2	25,2	70,8	55						
Thu, May 31, 2012	48	8	40	56	32,8	63,2	25,2	70,8	63						
Fri, Jun 1, 2012	48	8	40	56	32,8	63,2	25,2	70,8	67	67					
Fri, Jun 1, 2012	48	8	40	56	32,8	63,2	25,2	70,8	65	65		65			
Fri, Jun 1, 2012	48	8	40	56	32,8	63,2	25,2	70,8	70	70		70		70	
Wed, Jul 17, 2013	52	8	44	60	35,2	68,8	26,8	77,2	60						
Thu, Jul 18, 2013	52	8	44	60	35,2	68,8	26,8	77,2	51						
Thu, Jul 18, 2013	52	8	44	60	35,2	68,8	26,8	77,2	52						
Thu, Aug 8, 2013	52	8	44	60	35,2	68,8	26,8	77,2	57						
Wed, Aug 14, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	53						
Fri, Aug 16, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	52						
Thu, Aug 29, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	63						
Fri, Aug 30, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	53						
Thu, Sep 5, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	45						
Fri, Sep 6, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	43						
Thu, Sep 12, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	44						
Fri, Sep 13, 2013	51	8	43	59	34,6	67,4	26,4	75,6	57						



Média, Desvio Padrão e CV (%)
coeficiente de variação, calculados
a partir das corridas do operador

Calculations Based on Actual Data	
Number of Runs	30
Mean	57,4
Standard Deviation	21,5
CV (%)	37,4

Westgard Rules	Applied	Pass/Fail
Rule 1: One control value outside 2 SD.	Yes	Fail
Rule 2: One control value outside 3 SD.	Yes	Fail
Rule 3: Two consecutive values outside SAME 2 SD.	Yes	Fail
Rule 4: Two consecutive values outside OPPOSITE 2 SD.	Yes	Pass
Rule 5: Four consecutive values outside SAME 1 SD.	Yes	Fail
Rule 6: Ten consecutive values on SAME side of mean.	Yes	Pass

Action Taken:

Campo para preenchimento das
ações tomadas.

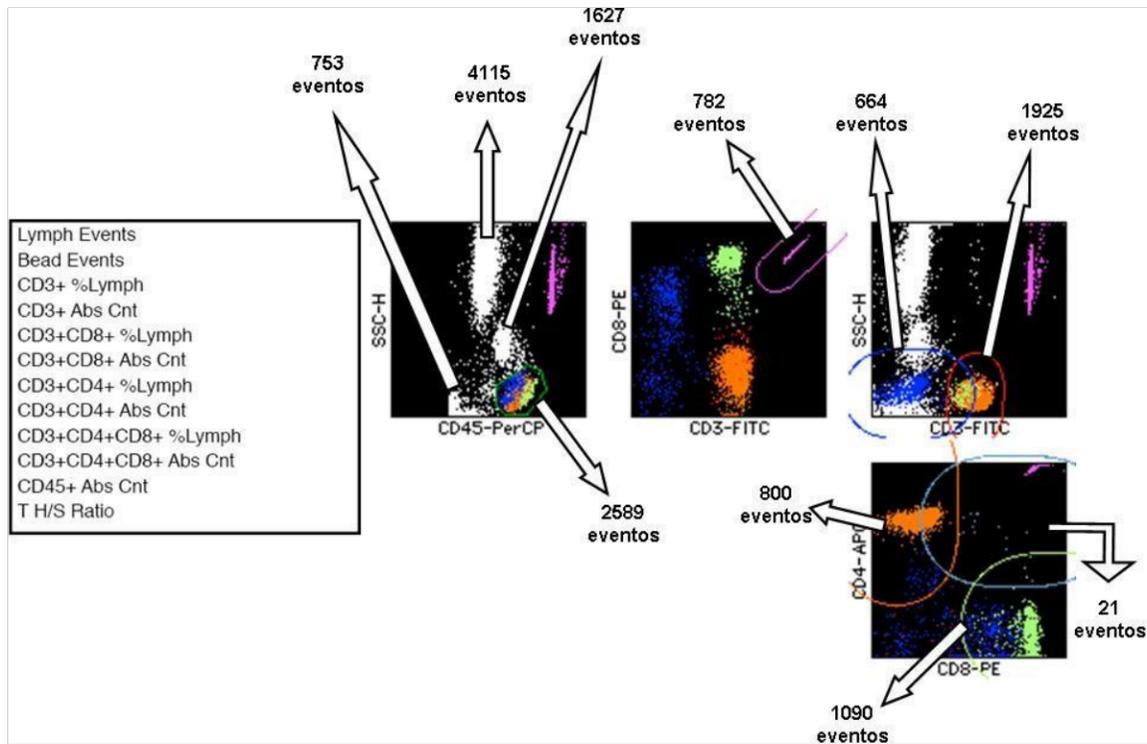
Regras de Westgard	Aplicado	Pass/Fail
Regra 1: Um valor de controle fora de 2SD.		
Regra 2: Um valor de controle fora do 3SD		
Regra 3: Dois valores consecutivos fora do MESMO 2SD		
Regra 4: Dois valores consecutivos fora do 2SD OPOSTO		
Regra 5: Quatro valores consecutivos fora do MESMO 1SD		
Regra 6: Dez valores consecutivos no MESMO lado da média		

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas Capítulo 2: Software BD FACStation das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.



EXERCÍCIOS

- Sabendo que o número do lote dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes é 90919 e o número de *beads* por pellet é 51724, determine os resultados abaixo (utilize uma calculadora):



- Você liberaria o resultado da questão anterior? Por quê?



3. A médica liga para o laboratório e diz que a contagem de CD45 do paciente 35 sugere que a sua análise está contaminada com monócitos. Como você pode garantir que esta contagem é real e que não há contaminação de monócitos? Qual é o caminho no software BD Multiset™ que te permite reanalisar dados já adquiridos?

4. O Dr. Luiz infectologista responsável pelo paciente Paulo, diz que a contagem de CD4 tanto o valor percentual quanto o valor absoluto do exame de Paulo não está de acordo com a condição clínica que ele vem apresentando atualmente (carga viral alta). Dr. Luís diz que os valores de CD4 estão altos demais. Pontue todos os argumentos que você utilizaria na conversa com o Dr. Luiz. Quais os pontos que você verificaria no resultado?

5. Quais tipos de tubos podem ser utilizados para a coleta de sangue para a rotina CD4/CD8?

6. Após a coleta, em quanto tempo o sangue deve ser preparado para a leitura no BD FACSCalibur™? E após preparada, em quanto tempo a amostra pode ser lida?



7. Quais condutas devem ser tomadas quando nos deparamos com os seguintes tipos de amostras?

a. amostra lipêmica:

b. amostra com fibrina:

c. amostra icterica:

d. amostra hemolisada:

e. amostra com coágulos:

8. Como devemos pipetar o sangue? Por quê?

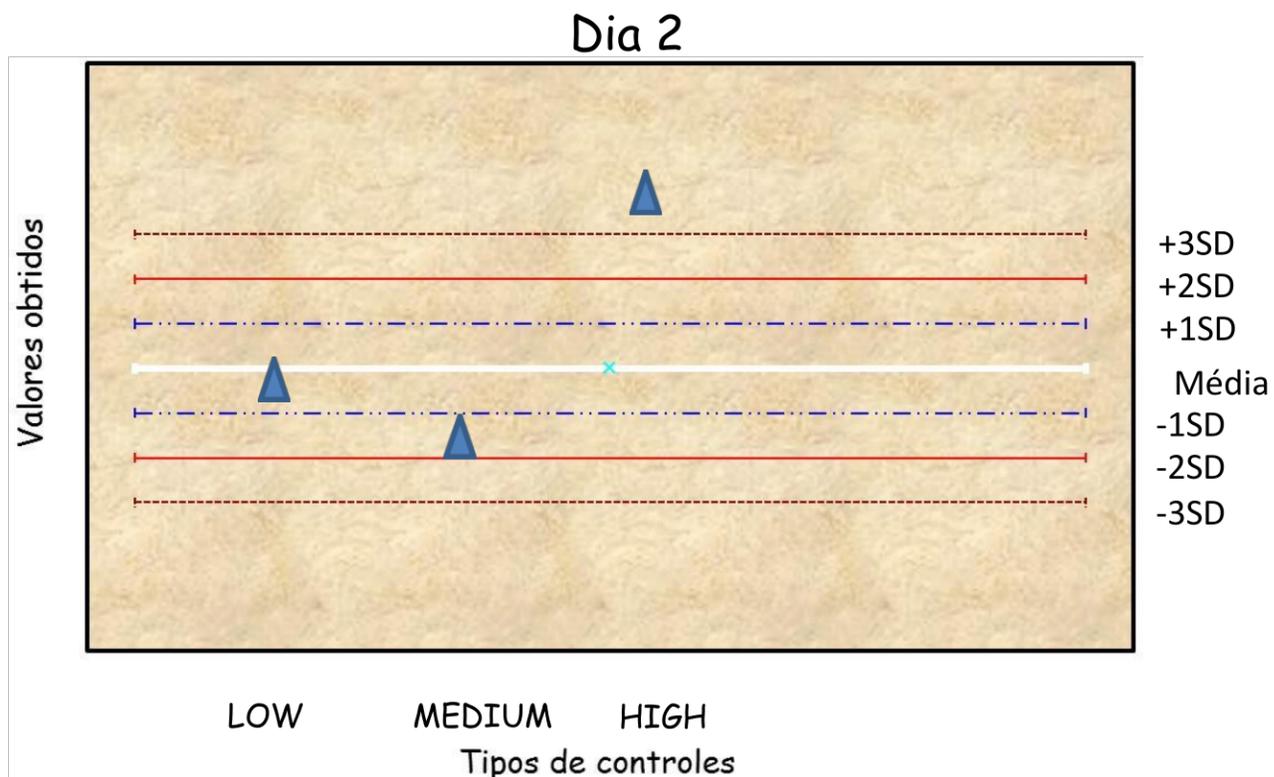
9. Quais são as funções da solução de lise? Como esta solução deve ser diluída para a rotina CD4/CD8 (mencione a concentração e o solvente)? Por quanto tempo a solução de lise diluída pode ser utilizada para a rotina CD4/CD8?



10. Devemos agitar bem os tubos dos BD Trucount™ Control Beads antes de pipetá-los ou isto é desnecessário? Explique. Quais seriam as conseqüências de não agitarmos os tubos dos BD Trucount™ Control Beads antes de pipetá-los?



11. Olhando o gráfico abaixo discuta com base nas regras de Westgard o comportamento dos controles lidos no dia 2 e quais ações você teria sobre a rotina desse dia.



PROBLEMAS E SOLUÇÕES

B. Amostras e Controles

Embora a fase analítica da quantificação de CD4/CD8 seja a fase onde a análise automática dos dados é feita pelo software BD Multiset™, ela não está livre problemas que só são identificados no momento da aquisição dos dados pelo operador. Por isso, antes de começar a leitura das amostras, é importante assegurar de que os lotes do anticorpo monoclonal BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes e do BD Trucount™ Control Beads foram inseridos no software corretamente. Além disso, o número de *beads* por pellet do BD Trucount™ Absolute Count Tubes e a média e desvio padrão das *beads* do BD Trucount™ Control Beads também devem ser inseridos e na lista de trabalho, o painel de trabalho deve estar correto para as amostras e controles.

Se durante a análise das amostra algum problema for observado, é necessário primeiramente identificar se o problema está ocorrendo em todas as amostras da rotina ou se o evento é algo particular da amostra em questão. Na identificação de qualquer uma das situações é sempre válido rever o protocolo de marcação da amostra, os reagentes e materiais utilizados. Veja na tabela abaixo os efeitos de alguns medicamentos nos resultados de citometria de fluxo para quantificação de linfócitos T CD4/CD8:



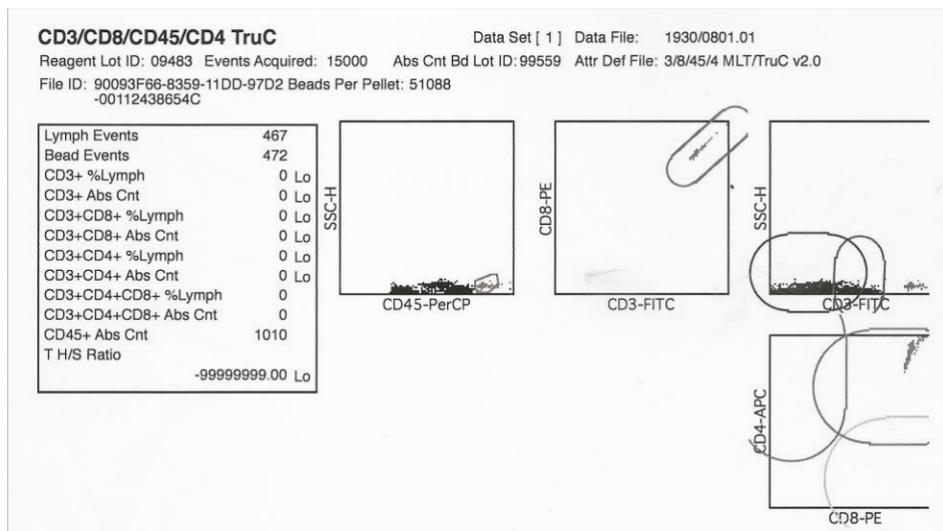
Agente	Efeito	Resultado
Zidovudine (AZT)	Aumenta a fragilidade de granulócitos e hemácias mais resistentes a lise	Dispersão de luz afetada (aumenta a contaminação do gate de linfócitos por granulócitos hemácias) Maior quantidade de “debris”
Antibióticos (ex: cefalosporina)	Aumenta a autofluorescência celular	Possíveis problemas em compensação ou em voltagem de PMTs
Corticóides	Diminui o nível de LTCD4+	Baixa contagem percentual e absoluta de LTCD4+
Exercícios físicos intensos	Diminui a contagem de linfócitos totais	Contagem baixa de todos os subtipos de linfócitos
Variação diurna	Variações nas contagens absolutas	
Imunossupressores (ex: OKT3)	Afeta a expressão de CD3	Problemas na identificação dos linfócitos T.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas na bula do BD Trucount™ Absolute Count Tubes, BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC e Capítulo 2: Software BD FACStation das Instruções de Uso *do BD FACSCalibur™*.

Lipemia

A lipemia, frequentemente encontrada em amostras de pacientes HIV positivos, é uma das situações citadas a cima. Sendo a citometria de fluxo uma metodologia que trabalha com a identificação de células baseada na detecção de fluorescência e dispersão de luz, a presença de compostos lipídicos podem afetar os resultados da técnica. Isso porque esses compostos têm influência nos parâmetros que nos fornecem resultados baseados na dispersão de luz, como por exemplo, os parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC). Amostras com lipemia intensa induzem uma perda na resolução dos parâmetros e conseqüentemente o que observamos é a compressão das células no eixo de SSC (granulidade) dificultando a separação das populações celulares em linfócitos, monócitos e granulócitos (veja o exemplo abaixo). Nesse trecho foram utilizadas as referências 9 e 10, descritas no capítulo final desse documento.





Para solucionar esse problema, o que se faz inicialmente, é a aquisição desse tipo de amostra em uma vazão onde se tem a melhor resolução da técnica, **RUN/LOW**, como citado acima. Na grande maioria dos casos, essa ação é suficiente para se obter o resultado de acordo com o perfil esperado. Porém, para as amostras cujo o grau de lipemia está bastante elevado, a alteração na vazão de amostra pode não funcionar.

A recomendação da BD para esses casos, é fazer a lavagem da amostra duas vezes com solução fisiológica a fim de remover o plasma lipêmico (ver protocolo de substituição de volume plasmático a seguir). Durante o procedimento, deve-se ter muito cuidado no momento de remover o plasma, para que a camada leucocitária permaneça intacta. Além disso, é importante que o volume de plasma retirado seja medido para que no final do procedimento de cada lavagem, o mesmo volume de **solução fisiológica** seja adicionado ao tubo. Feito isso, o protocolo de marcação da amostra deve ser realizado de maneira convencional seguindo o protocolo estabelecido pela BD.

Quando o procedimento acima é adotado, nossa ressalva é que no laudo médico se acrescente o comentário dizendo que a amostra passou por um procedimento de lavagem. Esse comunicado é muito importante uma vez que esse procedimento pode afetar as contagens absolutas. Por isso uma validação do método seria ideal e é individual de cada laboratório. Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.



Aglutininas

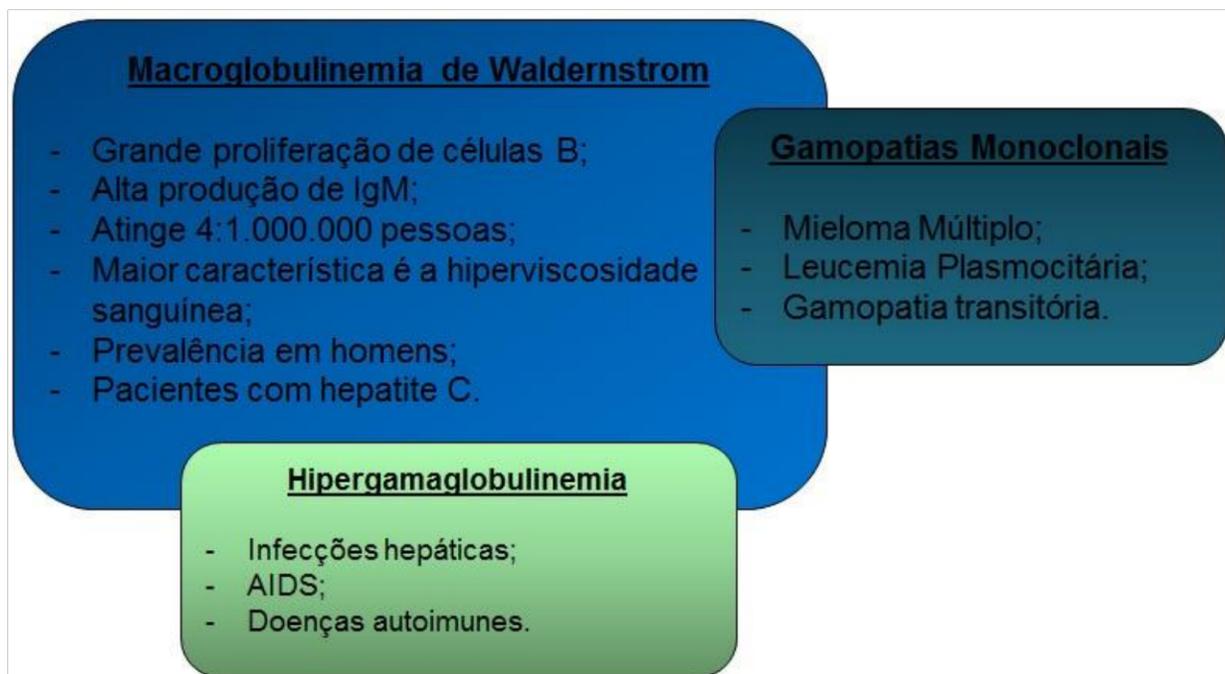
As auto-aglutininas são anticorpos capazes de aglutinar hemácias humanas. A habilidade desses anticorpos em destruir as hemácias encontra-se diretamente relacionada à sua capacidade em fixar complemento durante a exposição do paciente a baixas temperaturas, por exemplo, como é o caso das crioaglutininas. Uma das consequências da destruição das hemácias pelas auto-aglutininas é a anemia hemolítica auto-imune, que pode em sua grande maioria, ser causada por anticorpos quentes (IgG/C3) ou em uma frequência menor, por anticorpos frios (ou crioanticorpos), mais comumente encontrada em pacientes idosos (idade superior a 60 anos) ou ainda, de maneira aguda e transitória, em adultos jovens, após quadro infeccioso viral. Essas aglutininas podem ser:

- **Euglobulinas:** Todas as imunoglobulinas – IgM, IgG, IgA, IgD e IgE
- **Macroglobulinas:** Globulinas do plasma de peso molecular aumentado, as mais conhecida são: α -2macroglobulinas e β -2macroglobulinas (IgM) – Ligação formando IgM de cadeia pesada.

Algumas condições patológicas promovem o aumento dessas imunoglobulinas, que se ligam entre si formando imunocomplexos, que dificultam a ligação Ag-Ac, conforme referências 11 e 12.

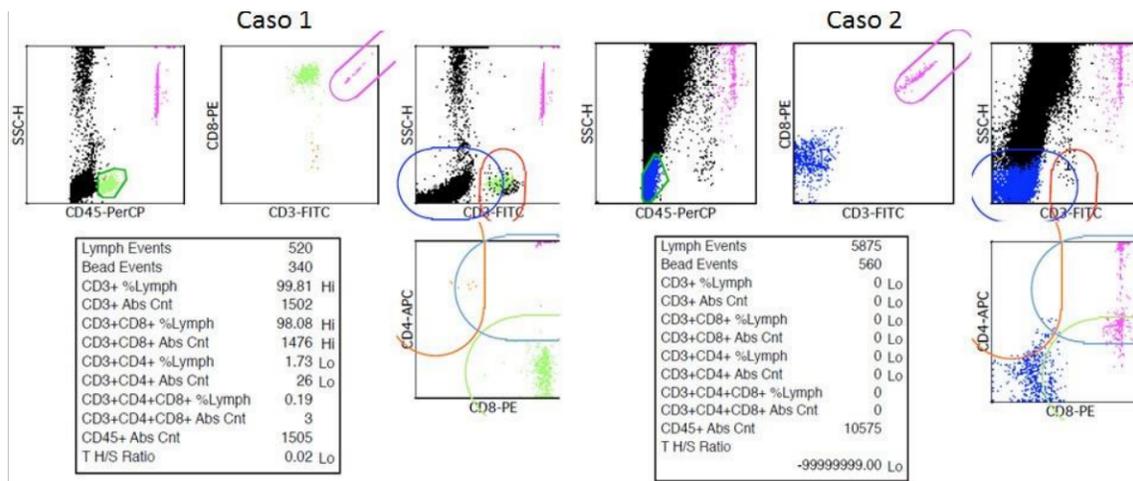
- ✓ Macroglobulinemia de Waldenström, Crioglobulinemias, etc.





Tal assunto merece foco durante o treinamento de quantificação de CD4/CD8 devido ao fato de a presença dessas globulinas influenciar, de maneira negativa, os resultados gerados pela citometria de fluxo. A presença de auto-anticorpos no plasma pode mascarar a identificação dos marcadores de superfície pelo anticorpos utilizados na metodologia, devido a formação dos imunocomplexos que atrapalham a ligação Ag/Ac.. Veja abaixo o perfil do resultado de quantificação de CD4/CD8 em dois casos contendo auto-aglutininas:





Inicialmente o problema pode ser solucionado com a incubação da amostra *in natura* em banho-maria a 37°C por 5 a 15 minutos, para tentar descartar o fato de termos a presença de crioaglutinas nas amostra. Porém, em alguns casos tal procedimento não é suficiente e se faz necessário dar início a um procedimento de lavagem da amostra (clarificação do plasma) assim como o realizado para amostra com lipemia intensa.



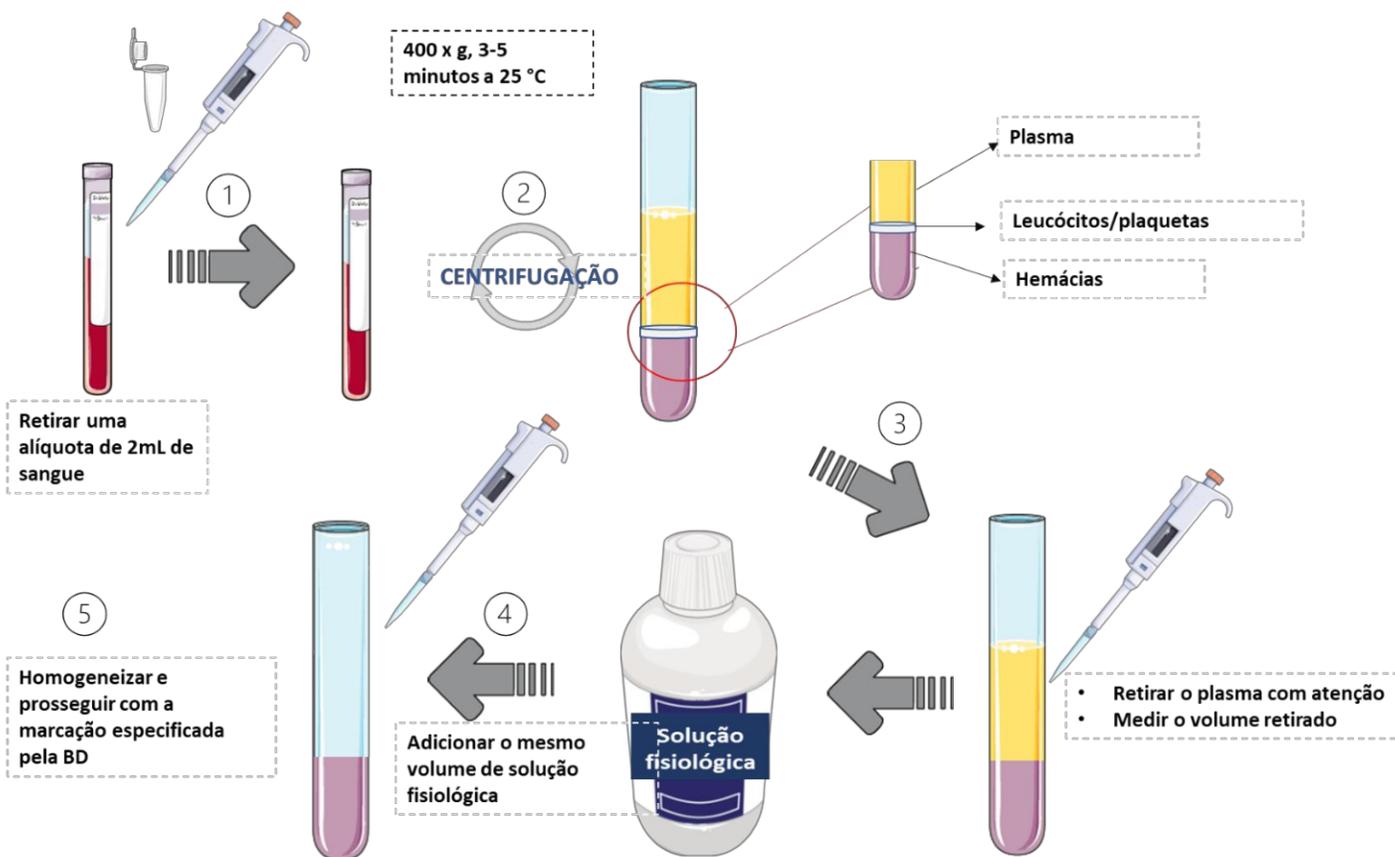
Protocolo de centrifugação e substituição do volume plasmático

1. Homogeneizar suavemente a amostra colhida em tubo de EDTA 10 vezes por inversão;
2. Separar uma alíquota de 2 ml de sangue do tubo primário. É importante conservar material (tubo primário) sem ter sido manuseado.
3. Centrifugar a amostra aliquotada 400g de 3 a 5 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25° C);
4. Após centrifugação retirar o plasma cuidadosamente para que a camada leucocitária seja mantida intacta (nesse momento é importante medir exatamente qual foi a quantidade de plasma retirado);
5. Substituir o volume de plasma retirado pelo mesmo volume de solução fisiológica;
6. Em seguida homogeneizar suavemente e processar a amostra normalmente segundo o protocolo de marcação da técnica recomendada pela BD;
7. Realizar a aquisição da amostra no citômetro de fluxo, BD FACSCalibur™.

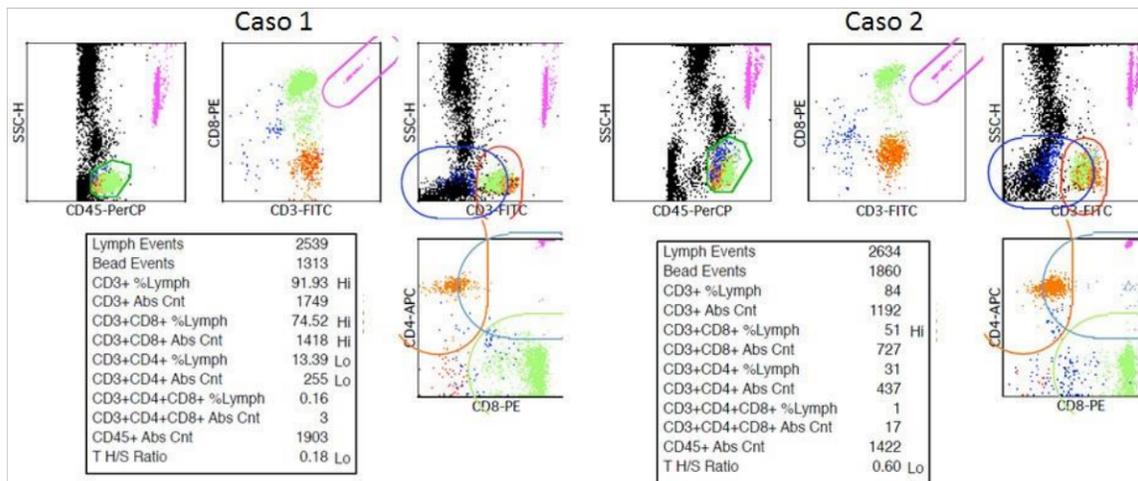


Quando o procedimento acima é adotado, nossa ressalva é que no laudo médico se acrescente o comentário dizendo que a amostra passou por um procedimento de lavagem. Esse comunicado é muito importante uma vez que esse procedimento pode afetar as contagens absolutas. Por isso uma validação do método seria ideal e é individual de cada laboratório.

Protocolo de remoção do plasma



Veja o perfil dos dois casos acima onde as duas amostras foram submetidas ao procedimento citado:

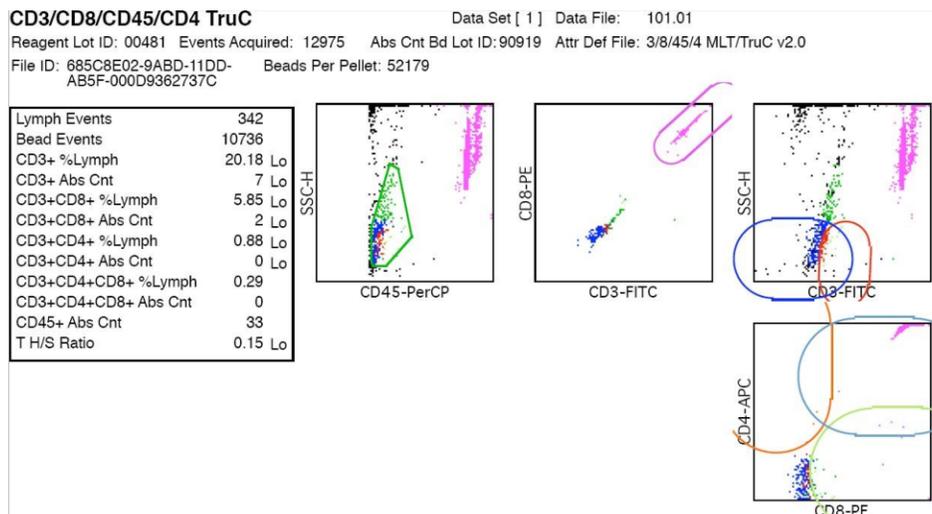


Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

Ausência de monoclonal

Este é um gráfico típico de uma amostra que foi preparada sem a adição do anticorpo. Verificamos ausência de populações positivas para todos os marcadores.

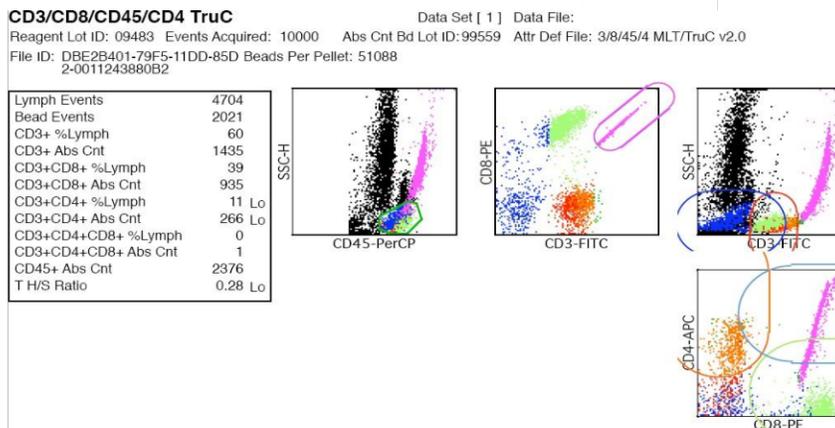




Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

Beads BD TruCount™ Absolute Count Tubes

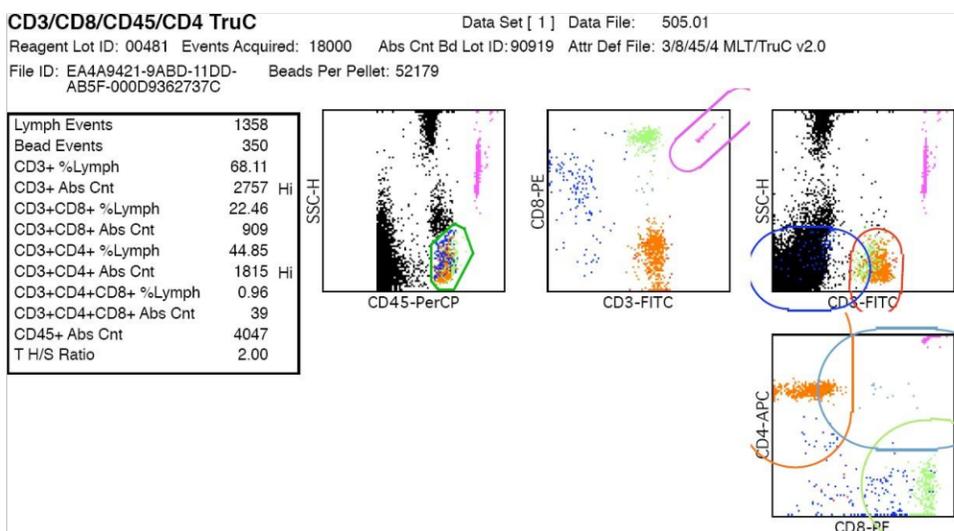
Este perfil de gráfico (*beads* “caídas” e populações achatadas) acontece em duas situações: quando o equipamento está com bolhas ou quando as amostras foram incubadas em ambiente claro. Para eliminarmos o problema de bolhas, devemos tirar a amostra e colocar água na probe de aspiração. Em seguida realiza-se alguns ciclos de primes e deixamos o equipamento aspirar água por 5 minutos em RUN/HI. Caso o problema persista, é preciso verificar se o local onde as amostras são incubadas está sendo iluminado. Se as amostras foram expostas à luz durante a incubação, é necessário prepará-las novamente.



Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

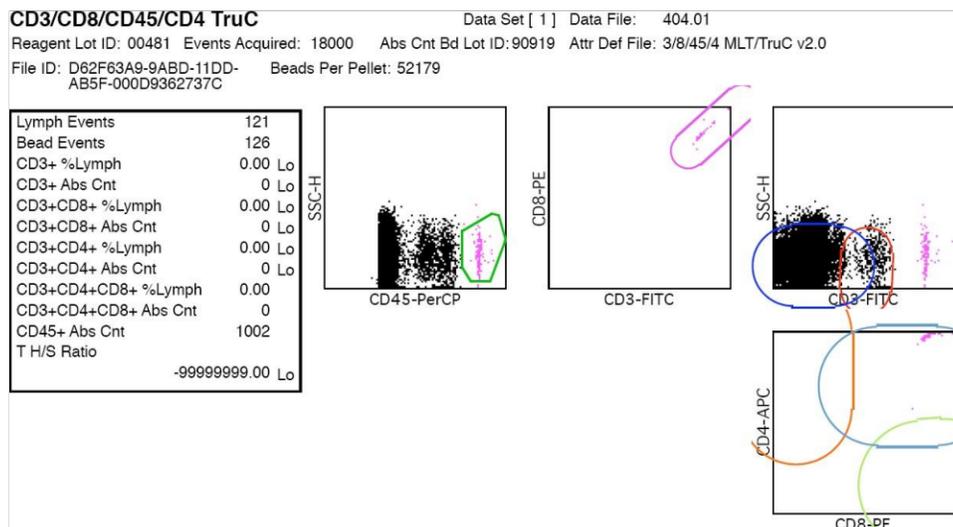
Lise dos eritrócitos

Este gráfico é representativo de amostras com lise incompleta. Isto acontece quando não se respeita o tempo mínimo de 15 minutos de incubação após a adição da solução de lise. Observamos um alongamento das populações no eixo SSC do gráfico CD45xSSC e um aumento na quantidade de debris, pelo excesso de hemácias íntegras.



Este gráfico é representativo de uma amostra preparada com solução de lise diluída em solução BD FACSCalibur™ (o certo é diluir a solução de lise em água deionizada, conforme a bula).



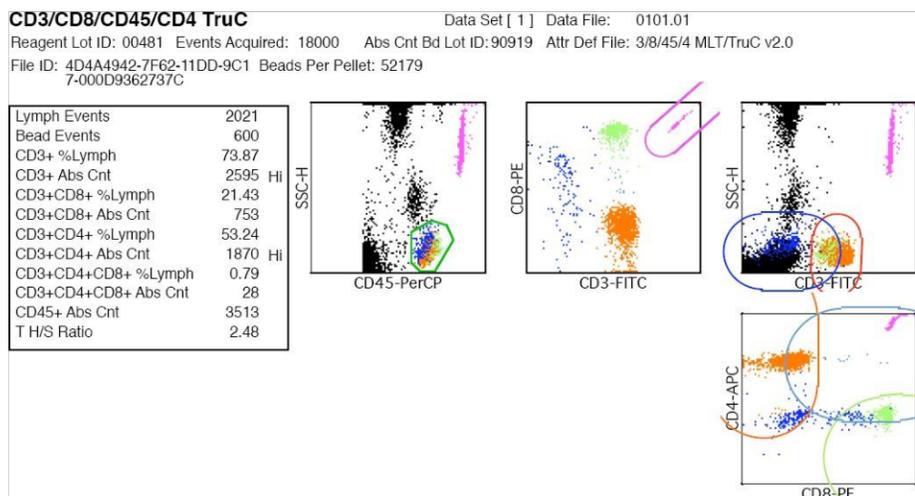


Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

Alteração em populações celulares

As populações CD4-CD8- e CD4-CD8+ no quarto gráfico (CD8xCD4) estão deslocadas ao longo do eixo Y. Devemos observar se este deslocamento acontece em todas as amostras ou em uma ou poucas amostras. Quando este perfil está presente em todas as amostras, devemos suspeitar de problemas na pressão – que podem ser causados por fechamento incompleto do tanque de BD FACSCalibur™ (deve-se verificar se a tampa está bem rosqueada) ou por sujeira no equipamento (deve-se realizar uma limpeza do sistema fluídico) – ou desalinhamento do equipamento (parar a rotina e passar as partículas BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC novamente). Se o problema persistir, deve-se entrar em contato com a BD. Quando este perfil é observado em apenas uma amostra, devemos observar se há algum ajuste de compensação que pode ser feito.





Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

Linfócitos T duplos positivos e linfócitos T duplo negativos

O gráfico abaixo apresenta um excesso de células duplo positivas (LTDP) e esta foi a única amostra que apresentou este perfil. Os linfócitos T CD4+CD8+ são células imaturas e são menos que 5% dos linfócitos totais. Podem aumentar em 20% nas infecções causadas por HIV e EBV.

O software BD Multiset™ considera estas células dentro das contagens dos linfócitos positivos apenas para CD4 ou CD8. Mas, o contrário não acontece, nem os linfócitos T helper, nem os citotóxicos são contabilizados nas contagens de linfócitos T duplo positivos. Ou seja, no exemplo abaixo temos um total de 60,85% de células CD3+CD4+%Lymph, este valor se refere à soma das populações CD3+CD4+CD8- e CD3+CD4+CD8+. O mesmo acontece com a população de linfócitos T CD8, o valor percentual é de 59,53% e se refere à soma das populações CD3+CD8+CD4- e CD3+CD4+CD8+.

Para a liberação deste resultado, é necessário fazer uma conta manual para tirar o valor de células duplo positivas e saber qual é o valor real de linfócitos T helper e linfócitos T citotóxicos do paciente e informá-lo ao clínico no campo de observação do laudo.



Cálculo manual:

$$\text{CD3+CD8+ \%Lymph} = 59,53 - 43,16 = 16,37\%$$

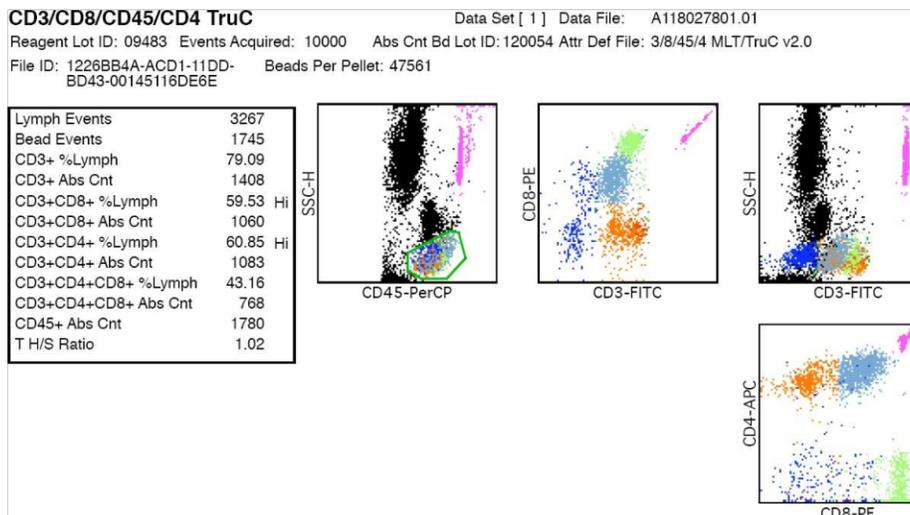
$$\text{CD3+CD8+ Abs Cnt} = 1060 - 768 = 292$$

$$\text{CD3+CD4+ \%Lymph} = 60,85 - 43,16 = 17,69\%$$

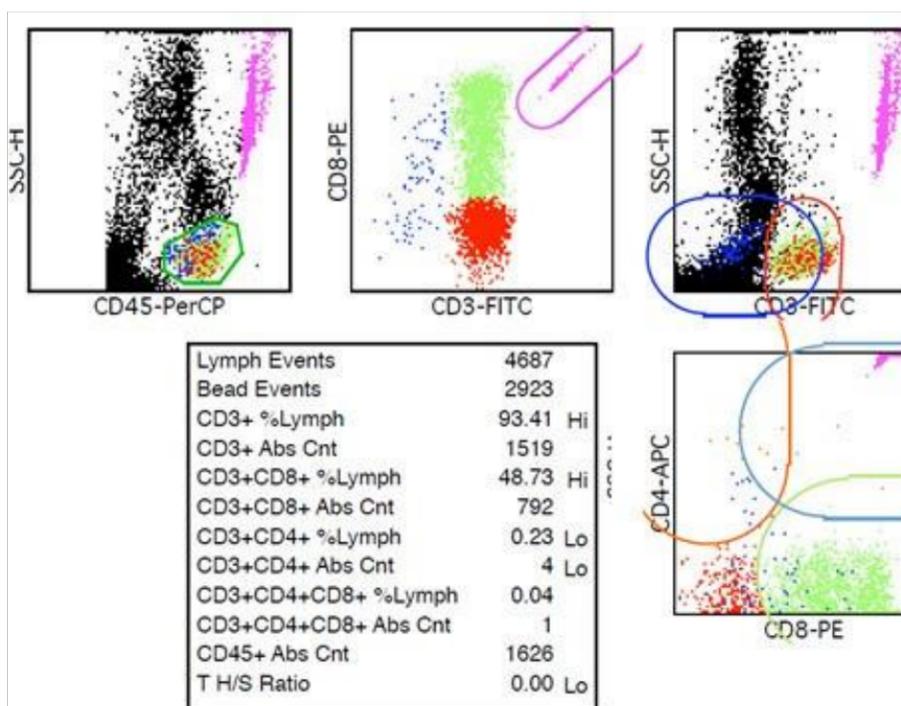
$$\text{CD3+CD4+ Abs Cnt} = 1083 - 768 = 315$$



Este cálculo manual deverá ser feito para todas as amostras que apresentarem mais que 10% de células duplo positivas. O valor liberado no SISCEL deve ser o valor encontrado no Lab Report, porém o valor encontrado pós a subtração dos valores deve estar na observação do laudo do SISCEL. Fica sob a responsabilidade do clínico responsável, a interpretação do resultado e a análise da relevância clínica dos valores encontrados. Além disso, deve-se acrescentar a seguinte observação no resultado: Amostra apresentando valores elevados de linfócitos T duplo positivos (CD4+CD8+): 43,16%; contagem absoluta = 768 células/ μl).



Em contrapartida, alguns pacientes apresentam uma pequena quantidade de Linfócitos T que não expressam CD4 nem CD8, são os chamados **Linfócitos T duplo negativos ou $LT\gamma\delta$. (LTDN)**. Essas células estão em uma frequência menor que 5% dos linfócitos, possuem um fenótipo CD3+, CD3+CD4-CD8- OU CD3+CD4-CD8^{DIM} e são granzima B e perforina positivas, reconhecem antígenos independente de MHC, participam da resposta imune inata e possuem localização privilegiada nas mucosas. É possível observar em grande parte das amostras, que no gráfico de CD4 APC x CD8 PE existe uma população vermelha localizada a esquerda no eixo de CD8 PE e para baixo no eixo de CD4 APC, ou seja, no quadrante duplo negativo. Veja na figura abaixo.



- ✓ Essas células não são contabilizadas como linfócitos T duplo negativos (CD4- e CD8-), mas entram na contagem de CD3, porque são linfócitos T. Por isso, mesmo depois de fazer o cálculo dos LTDP os valores para linfócitos T ainda não dão exatamente o que as contagens mostram no Lab Report.
- ✓ A presença de linfócitos T duplo negativos na periferia pode ser de origem normal, reacional devido a infecção pelo HIV e outras patologias associadas e pode ser também patológica.

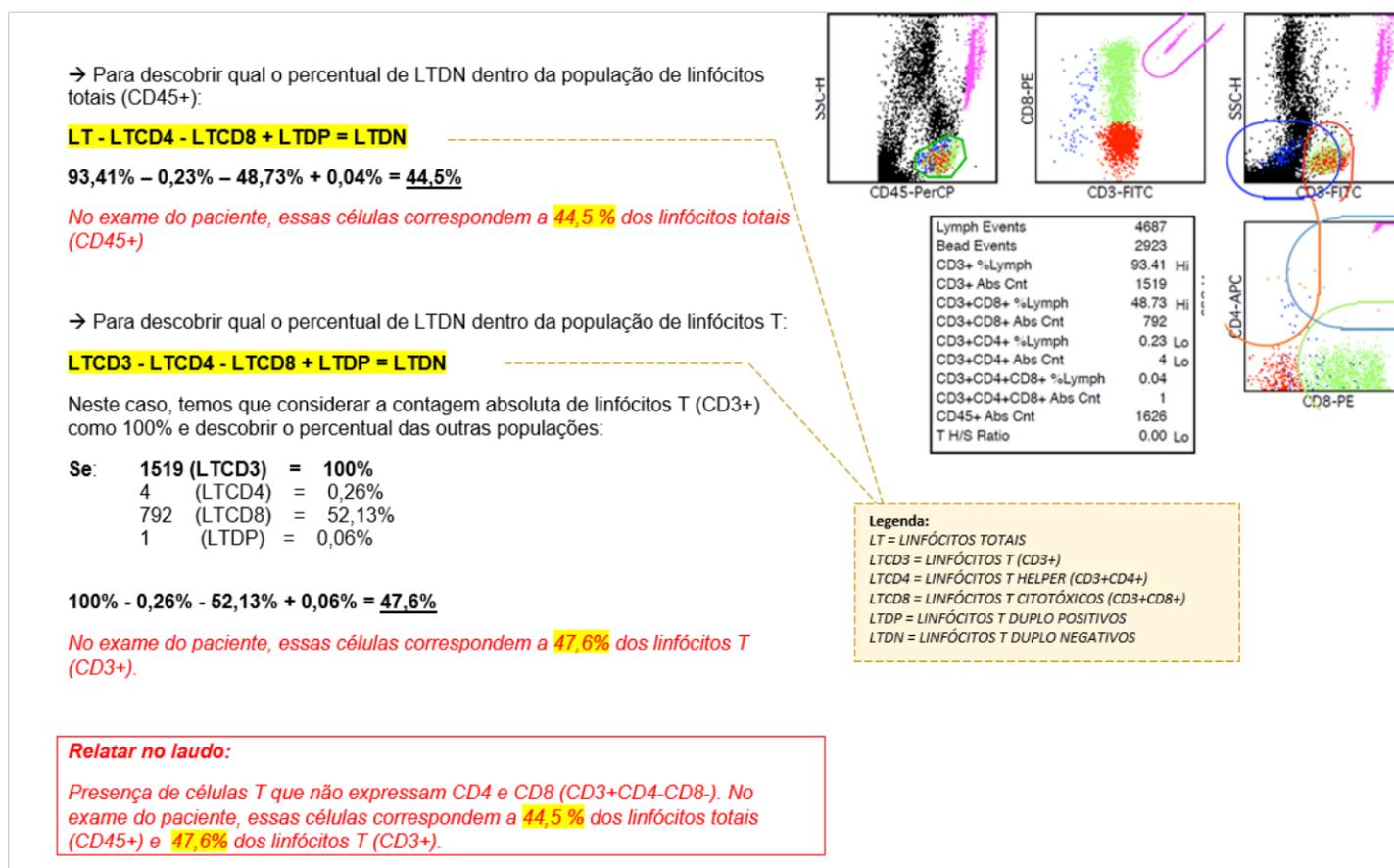
- ✓ Entre as patologias que podem estar associadas a elevada quantidade de linfócitos T duplo negativos estão: Síndrome Linfoproliferativa Autoimune (ALPS), neoplasias como linfoma T $\gamma\delta$, leucemia aguda T duplo negativo. Por isso, é extremamente importante reportar ao clínico o resultado encontrado. Principalmente quando essas células representarem 10% ou mais dos linfócitos T.

Para encontrar o valor de LTDN na amostras exemplo na figura abaixo::

$$LT - LTCD4 - LTCD8 + LTDP = LTDN$$

Legenda: LT = LINFÓCITOS TOTAIS/ LTCD4 = LINFÓCITOS T HELPER (CD3+CD4+)/ LTCD8 = LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS (CD3+CD8+) /

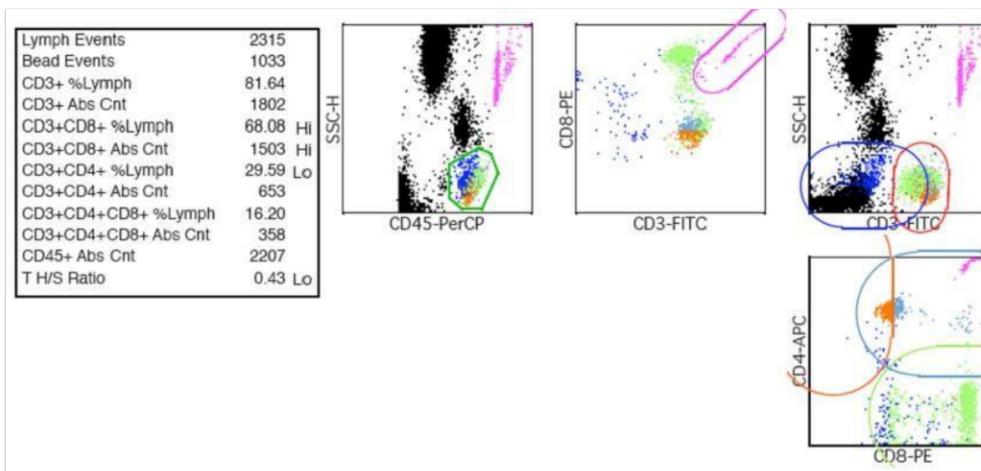
LTDP = LINFÓCITOS T DUPLO POSITIVOS/ LTDN = LINFÓCITOS T DUPLO NEGATIVOS



Nessa seção foi utilizada a referência 9 descrita no capítulo final desse documento, além de informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

Compensação de amostra

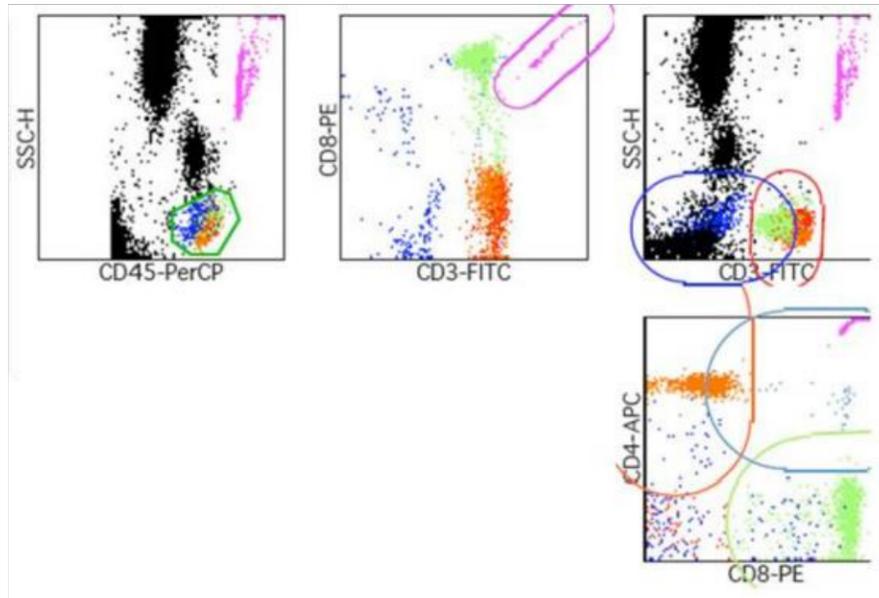
O gráfico abaixo, parece haver um problema de compensação específico para a amostra, uma vez que isto ocorreu com apenas uma amostra dentre todas da rotina. As populações CD8⁻ aparecem como se fossem CD8⁺ (observe a população de linfócitos T helper como está “entrando” na de T duplo-positivos), gerando, conseqüentemente, contagens errôneas, principalmente de linfócitos T duplo-positivos. Vendo que, claramete, a população de linfócitos T CD4⁺ pode ser identificada e, obviamente, não é duplo-positiva, como podemos chegar à contagem mais correta?



Normalmente, deveríamos aumentar a compensação de **FL2-%FL1** especificamente para a amostra que apresentou tal performance. Porém esta ação não gerou nenhuma melhora. Fica claro que o problema não é a interferência de FL1 em FL2. Mas, então, o que seria?



Passamos a considerar a hipótese de FL3 interferir em FL2, já que, no 2º e no 4º gráficos, as populações são todas altamente positivas para PerCP (FL3). Assim, ao realizarmos o aumento da compensação **FL2-%FL3**, as populações CD8⁻ (linfócitos T CD4⁺, em especial) migraram para suas regiões-alvos no gráfico CD8 x CD4 e as contagens se corrigiram. Veja abaixo o resultado do ajuste correto:



Nessa seção foram utilizadas informações validadas pela própria equipe de assessoria para mimetizar problemas que podem ocorrer durante a rotina laboratorial. Dados gerados no centro de treinamento da BD.

Códigos de erros

Além de observarmos o perfil das populações nos gráficos, não devemos nos esquecer de observar as mensagens de controle de qualidade que aparecem embaixo dos gráficos. Estas mensagens nos alertam principalmente sobre:

- Integridade da amostra questionável (excesso de debris presentes em amostras velhas ou hemolisadas).
- Contagem de *beads* inferior a 500 eventos.
- Contagem de linfócitos inferior a 2000 eventos

Muitas vezes observamos mensagens que nos dizem que os valores das contagens absoluta ou percentual se encontram fora dos valores de referência. Esta é uma mensagem normal considerando-se que a própria condição do paciente HIV+ faz com que ele apresente alterações nas contagens das subpopulações de linfócitos e não tenha um perfil semelhante a um indivíduo saudável. Além do mais, os valores referenciados pelo software são valores de referência para a população americana saudável.

As tabelas abaixo contêm códigos de erros que podem aparecer no Lab Report e Physician Report juntamente com a solução sugerida para cada um deles.

Código	Mensagem de Erro	Solução
1	Não foi possível adquirir [x] eventos requisitados pelo usuário.	<ol style="list-style-type: none">1 Diminua o valor Min Events to Acquire (Número Mínimo de Eventos a ser Adquirido) na janela Reagent Tools (Acquisition Target Info).2 Ajuste os critérios de interrupção de aquisição em Events Preferences (Preferências de Eventos).3 Se necessário, ajuste o gate da população alvo ou para aquisição ou modo attractor na tela Manual Gate.4 Aumente o limiar se houver excesso de detritos.
2	Não foi possível adquirir eventos [de 500 esferas] definidos por BDIS.	<ol style="list-style-type: none">1 Em Events Preferences (Preferências de Eventos), ajuste os critérios de interrupção de aquisição para um número de eventos requisitado pelo usuário.2 Inspeccione visualmente. Se necessário, ajuste o gate para capturar totalmente a população de esferas dentro da região de análise attractor na tela Manual Gate.3 Aumente o limiar se houver excesso de detritos.



Mensagem em inglês:

Código 1= Could not acquire the user requested [x number of population] events

Código 2= Could not acquire the BDIS preferred [500 bead] events

Possíveis problemas/soluções durante a aquisição

1. Sem eventos apresentados e Status = READY

CAUSA	SOLUÇÃO
O parâmetro Threshold está ajustado muito baixo.	Aumente o parâmetro Threshold.
Nível de Threshold está muito alto.	Diminua o parâmetro Threshold.
Threshold foi ajustado no parâmetro errado	Ajuste o parâmetro correto para a aplicação.
Não há amostra no tubo	Adicione amostra no tubo ou coloque um novo tubo de amostra
Amostra não foi homogeneizada corretamente	Homogeneize a amostra para ressuspender as células
Tubo de injeção de amostra está entupido	Remova o tubo da amostra para que ocorra o refluxo. Se o entupimento persistir, faça uma limpeza após aquisição.
Vedação Bal está gasta	Substitua a Vedação Bal
Falha de comunicação entre o computador e o BD FACSCalibur™	Desligue o computador e o equipamento, religando primeiro o equipamento e depois o computador.

As informações contidas nessa e nas próximas seções podem ser encontradas no Capítulo 9: Resolução de problemas, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.



2. Se na janela *Status* aparecer *Standby*, verifique o seguinte:

CAUSA	SOLUÇÃO
O botão do controle de fluidos não está em RUN.	Pressione o botão do controle de fluidos RUN.
O tubo da amostra não está instalado ou não está devidamente ajustado.	Instale o tubo da amostra no citômetro de forma adequada.
Tubo de amostra está rachado.	Substitua o tubo da amostra.
A tampa do reservatório não está fechada	Feche a tampa do reservatório de tampão.
A tampa de segurança que fica sobre o reservatório de tampão não foi colocada ou não está encaixada de forma correta	Verifique se a tampa de segurança está colocada sobre o reservatório de tampão e se a mesma está encaixada adequadamente.
A válvula da pressão está desligada	Leve a válvula da pressão para frente para ligá-la.
A tubulação do reservatório de tampão ou filtro não estão conectados corretamente.	Verifique os conectores das tubulações e se há rachadura no reservatório de tampão
Vedação Bal	Substitua



3. Alta velocidade de eventos na amostra:

CAUSA	SOLUÇÃO
Há bolhas de ar na câmara de fluxo	Pressione o botão Prime para drenar e completar a câmara de fluxo
Bolhas de ar no filtro do tampão	Retire as bolhas de ar do filtro
Threshold muito baixo	Ajuste Threshold
A velocidade do fluxo da amostra está ajustada em HI	Ajuste a velocidade do fluxo da amostra para MED ou LO

4. Baixa velocidade de eventos na amostra:

CAUSA	SOLUÇÃO
Limiar (threshold) muito alto	Ajuste o Threshold
Amostra não está homogeneizada adequadamente	Homogeneize a amostra para suspender as células
Entupimento no tubo de injeção da amostra	Coloque um tubo contendo hipoclorito 0,5% e deixe correr por 20 minutos. Em seguida, coloque um tubo com água destilada e deixe correr por 10 minutos.



5. Parâmetros de dispersão aparecem distorcidos:

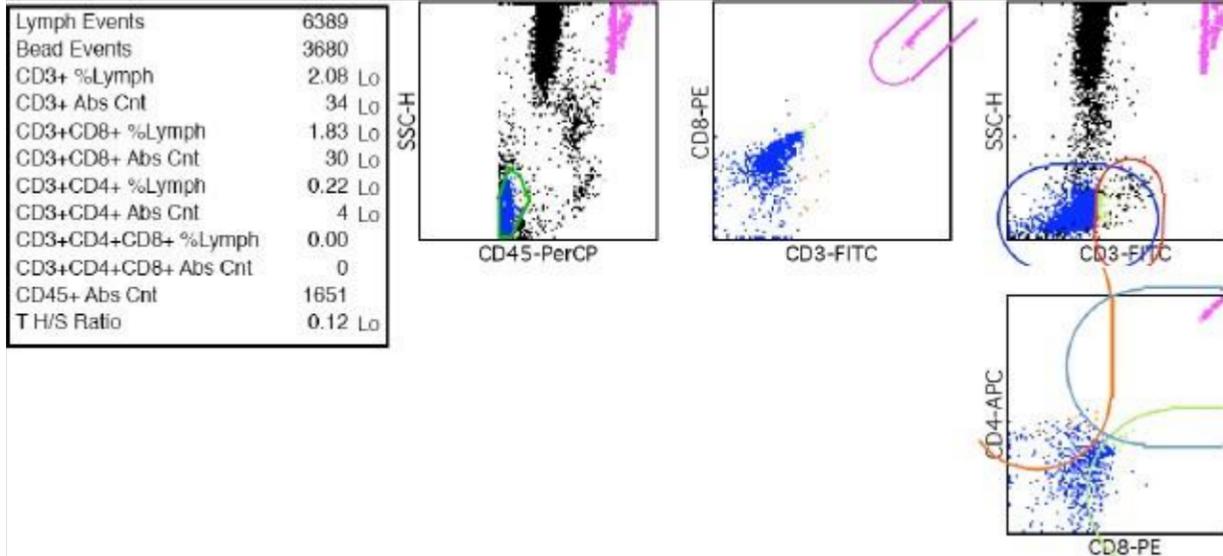
CAUSA	SOLUÇÃO
É necessário ajustar o Instrument Settings	Execute o procedimento de otimização
Há bolhas de ar na câmara de fluxo	Pressione o botão Prime para drenar e completar a câmara de fluxo
Vazamento de ar no filtro de BD FACSFlow™	Retire o ar do filtro de solução BD FACSFlow™
Sujeira na câmara de fluxo	Faça a limpeza do sistema fluidoico.
Fuga de ar no reservatório de BD FACSFlow™	Verifique os conectores no sensor de BD FACSFlow™. Verifique o status de voltagem da amostra, em modo RUN e sem o tubo de ensaio . Se for <10,2, substitua o reservatório de fluido de revestimento, a tampa e então a vedação.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas Capítulo 9: Resolução de problemas, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.



EXERCÍCIOS

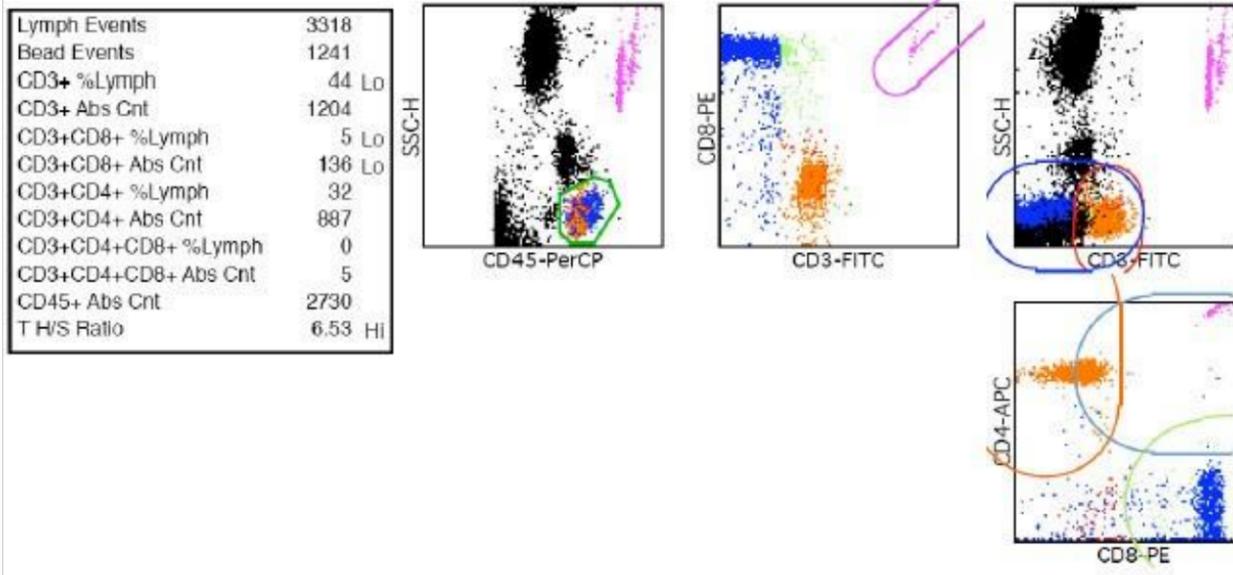
1. Analise os gráficos abaixo e escreva qual seria a solução para cada problema. Mais que uma solução é possível para alguns casos.





Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

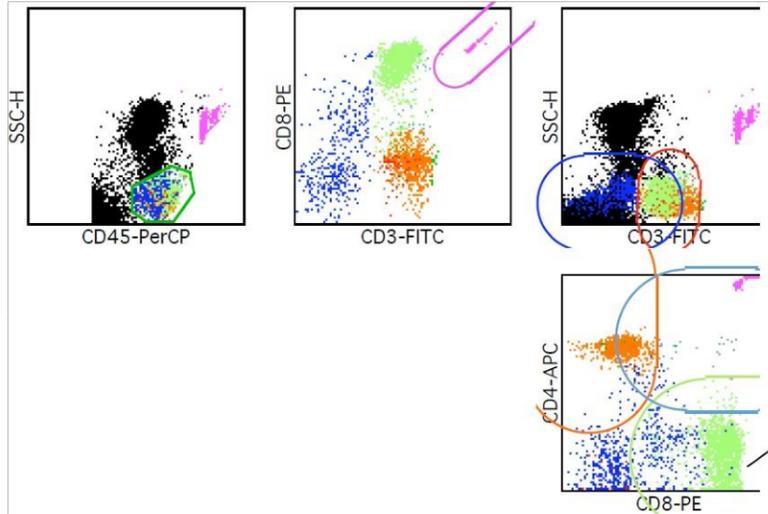
BD FACSCalibur™



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™

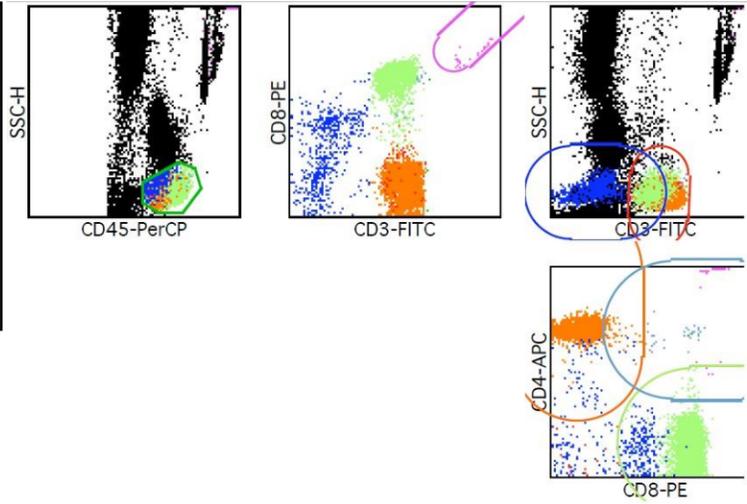
Lymph Events	5212	
Bead Events	1650	
CD3+ %Lymph	59	
CD3+ Abs Cnt	1812	
CD3+CD8+ %Lymph	44	Hi
CD3+CD8+ Abs Cnt	1345	Hi
CD3+CD4+ %Lymph	14	Lo
CD3+CD4+ Abs Cnt	438	
CD3+CD4+CD8+ %Lymph	1	
CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt	18	
CD45+ Abs Cnt	3086	
T H/S Ratio	0.33	Lo



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

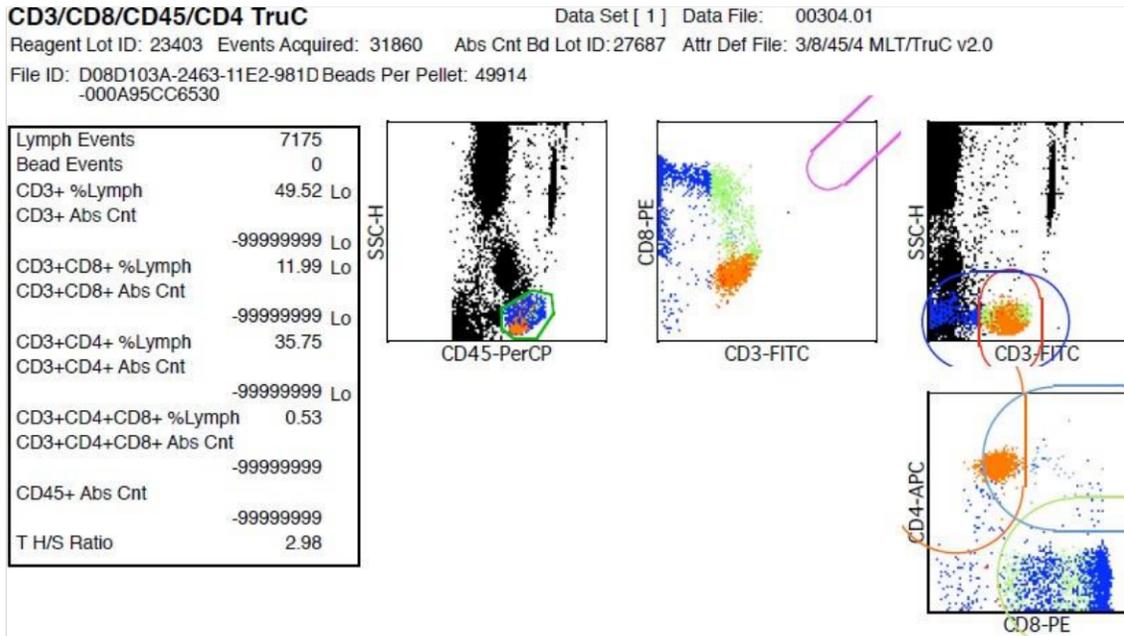
BD FACSCalibur™

Lymph Events	19866	
Bead Events	40	
CD3+ %Lymph	88	Hi
CD3+ Abs Cnt	441353	Hi
CD3+CD8+ %Lymph	67	Hi
CD3+CD8+ Abs Cnt	333144	Hi
CD3+CD4+ %Lymph	21	Lo
CD3+CD4+ Abs Cnt	103144	Hi
CD3+CD4+CD8+ %Lymph	0	
CD3+CD4+CD8+ Abs Cnt	907	
CD45+ Abs Cnt	500623	
T H/S Ratio	0.31	Lo



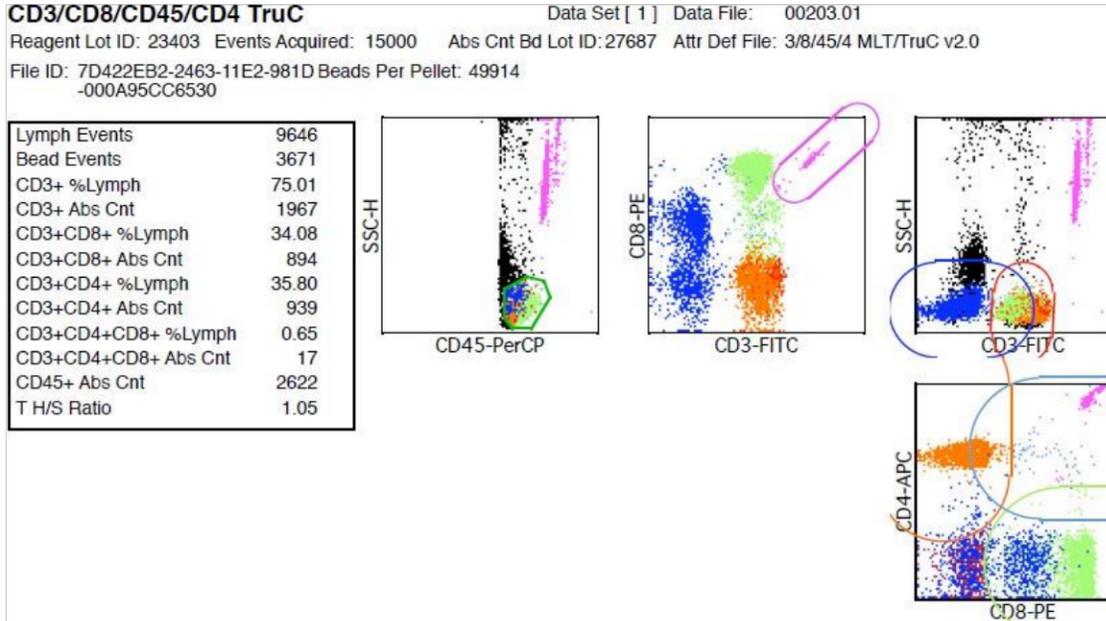
Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™



EXERCÍCIOS PARA REVISÃO DO BD MULTISSET™

Para todas as questões assinale a alternative CORRETA.

1. Nesta tela:

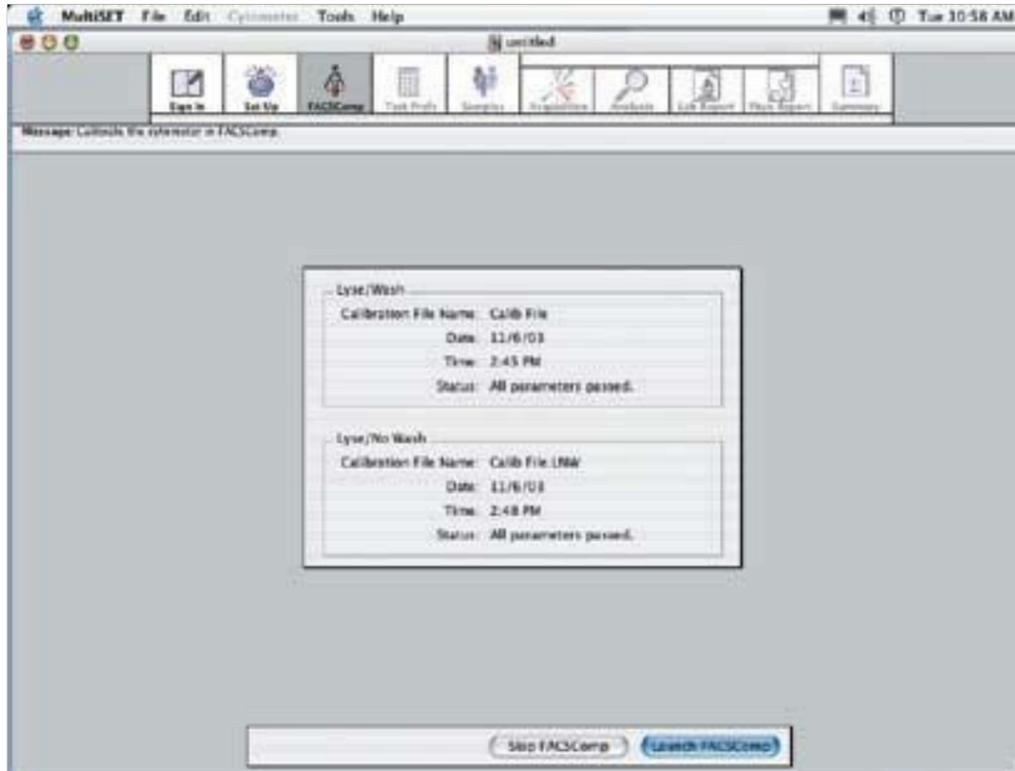
The screenshot shows the BD Multiset software interface with the following settings:

- Data Source:**
 - From Data Files
 - From Cytometer: Acquisition with Analysis
 - From Cytometer: Acquisition Only
- Entry Level File Name Prefix:**
 - Sample Name
 - Case Number
 - Sample ID
 - Date - DDMMYY
 - Custom
- Add Entry Number as Prefix
- View Reports:**
 - Until "Next" Button Pressed
 - For: 1 minute
- Automatic Saving Options:**
 - Data Files (Location...)
 - Laboratory Report (Location...)
 - Physician Report (Location...)
 - Summary Report (Location...)
 - Use Date Generated File Name (FACStationG5:BD Files:...s:281008:281008.sum)
 - Export Document (Location...)
 - Use Date Generated File Name (FACStationG5:BD Files:...es:281008:281008.exp)

- Preciso deixar assinalado *From Data Files* em *Data Source* para adquirir as amostras.
- Se eu deixar assinalado "Until next button pressed", assim, só passarei para a próxima amostra quando clicar em NEXT.
- Não preciso selecionar *Export Document* para que o documento de exportação seja criado.



2. Nesta tela:



- a) preciso inserir os números de lote das *beads* do BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC
- b) posso verificar a última vez que o BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC foi passado, mas não vejo o dia e a hora e nem se os parâmetros foram aprovados
- c) posso iniciar o BD FACSComp™ para passar o BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC.



3. Nas telas abaixo:

Lot IDs

	Reagent Name	Lot ID
<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="text-align: center;"> Reagents</div> <div style="text-align: center;"> Absolute Count Beads</div> <div style="text-align: center;"> Control Beads</div> </div>	CD4/CD8/CD3	00000
	CD3/CD4/CD45	00000
	CD3/CD8/CD45	00000
	CD3/CD19/CD45	00000
	CD3/CD16+56/CD45	00000
	CD3/CD8/CD45/CD4	00481
	CD3/CD16+56/CD45/CD19	00000

Lot IDs

	Control Bead Lot IDs	
<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="text-align: center;"> Reagents</div> <div style="text-align: center;"> Absolute Count Beads</div> <div style="text-align: center;"> Control Beads</div> </div>	Bead Name: TruCount Control	
	Lot ID: <input type="text" value="97194"/>	
	Low Beads/μL: <input type="text" value="51"/>	SD: <input type="text" value="8.10"/>
	Medium Beads/μL: <input type="text" value="253"/>	SD: <input type="text" value="22.00"/>
	High Beads/μL: <input type="text" value="1020"/>	SD: <input type="text" value="66.30"/>
	<input type="button" value="Cancel"/> <input type="button" value="Save"/>	

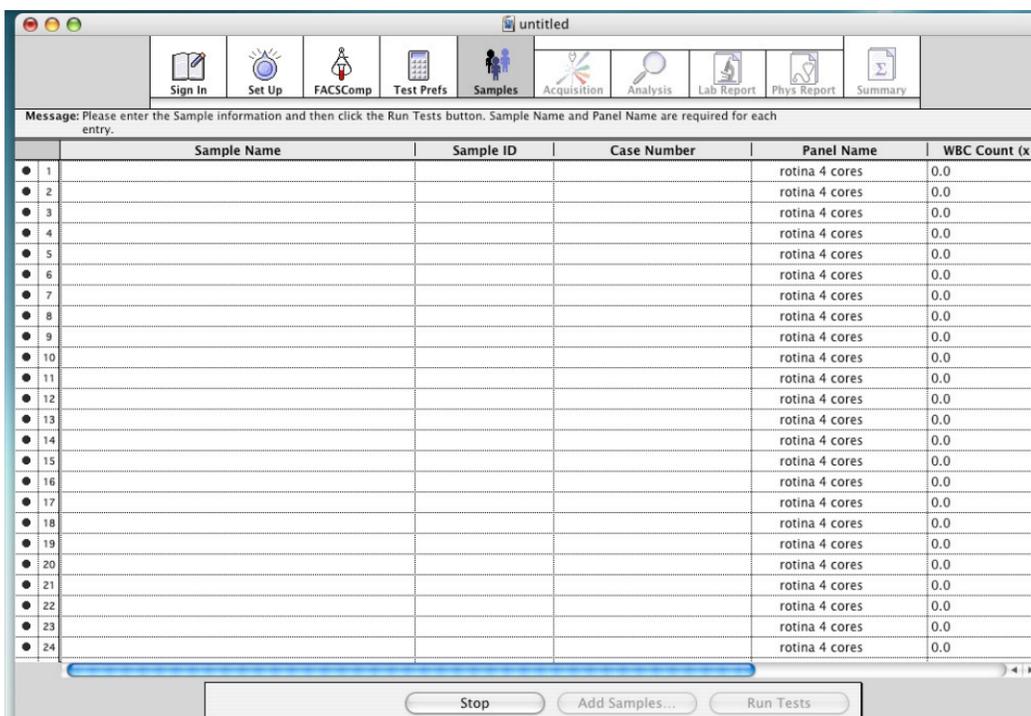
Lot IDs

	Absolute Count Bead Lot IDs	
<div style="display: flex; flex-direction: column; gap: 10px;"> <div style="text-align: center;"> Reagents</div> <div style="text-align: center;"> Absolute Count Beads</div> <div style="text-align: center;"> Control Beads</div> </div>	Bead Name: TruCount	
	Lot ID: <input type="text" value="90919"/>	
	Beads/Pellet: <input type="text" value="52179"/>	
<input type="button" value="Cancel"/> <input type="button" value="Save"/>		



- a) Em *Lot IDs* são inseridas informações sobre os lotes do BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes e das beads do BD Trucount™ Control Beads
- b) Quando insiro o lote do BD Trucount™ Control Beads, a contagem média de *beads* e os desvios padrão são preenchidos automaticamente
- c) Só preciso informar o lote dos BD Trucount™ Absolute Count Tubes e não é necessário inserir a contagem de *beads*

4. Na tela abaixo:

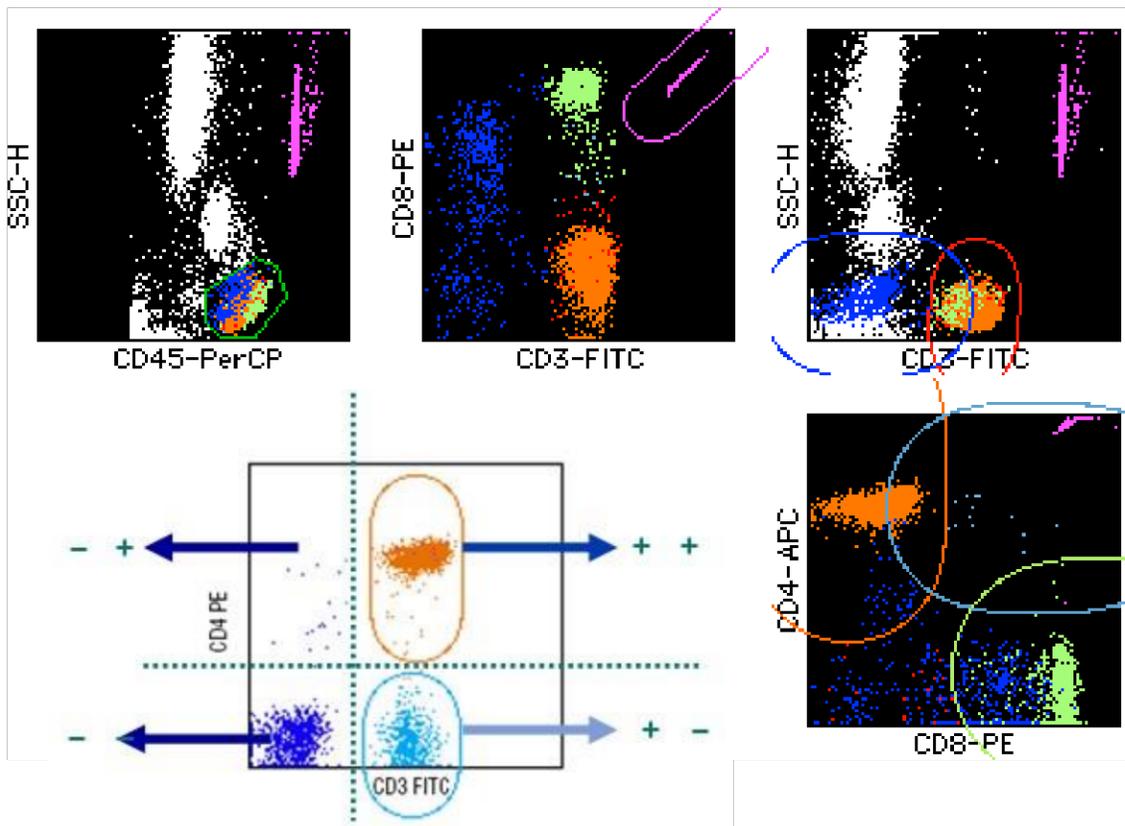


- a) Não é necessário modificar o painel quando vou passar os controles.
- b) Após inserir os pacientes devo salvar a lista de amostras clicando em *File > Save as*. O nome do arquivo será o dia em questão com a terminação ".sch" e o ideal é salvá-la em uma pasta padrão, de preferência em FACStation-BD Files- BD Multiset™ Files- Pasta do dia



c) Posso inserir até 110 pacientes por lista. Caso o número de pacientes exceda posso criar uma nova lista savá-la com um nome diferente do da anterior.

5. Sobre as populações celulares:

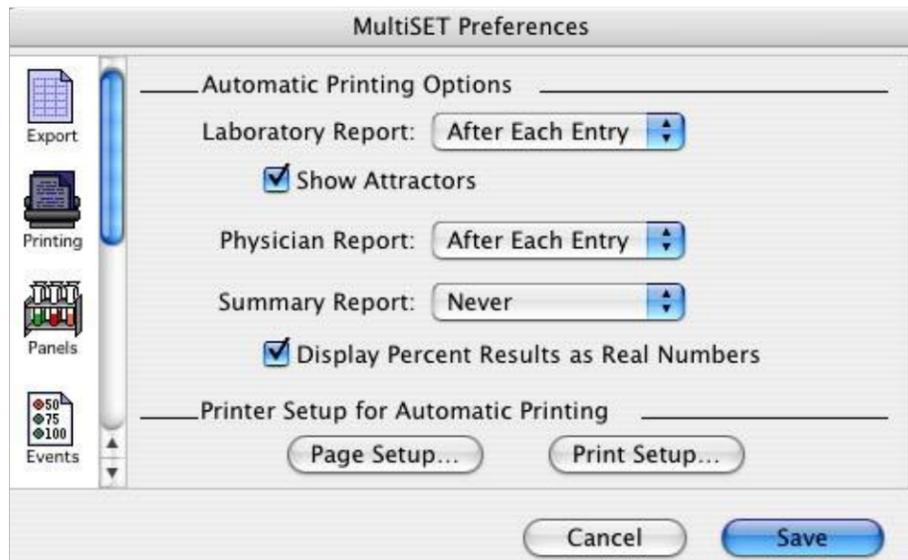


a) A população em rosa representa os debrís.

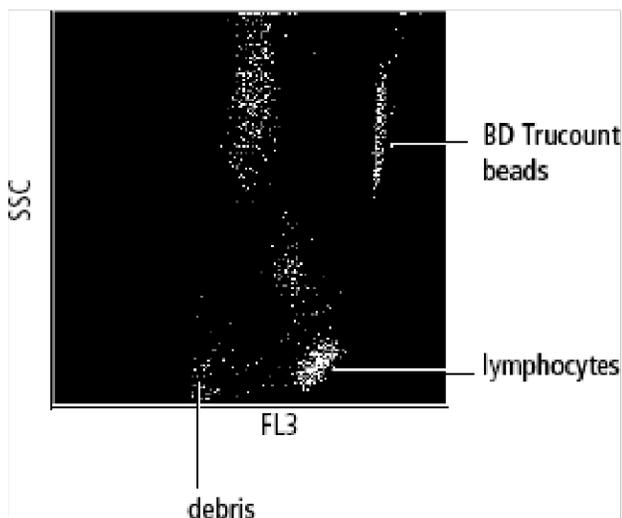
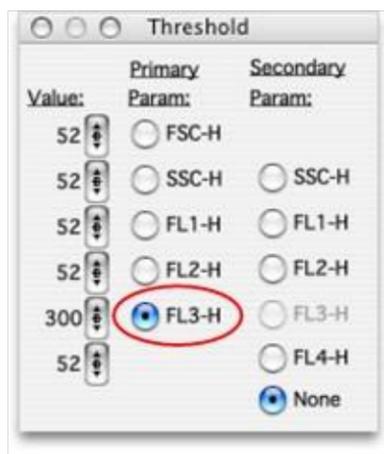
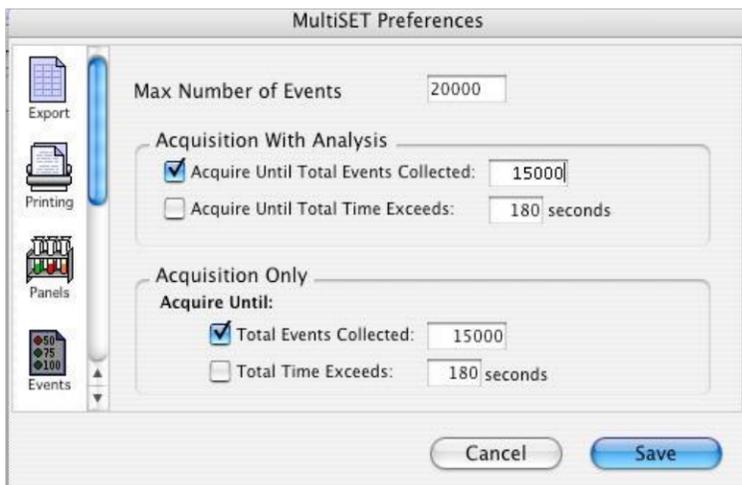
b) O gate no gráfico CD45xSSC é para linfócitos T.

c) No gráfico CD3xCD8 a população que se encontra no canto superior esquerdo é positiva para CD8 e negativa para CD3 sendo denominada células NK.

6. Tenho as seguintes seleções na opção Printing em BD Multiset™ preferences. Qual ou quais laudos serão impressos durante a rotina neste caso?



7. Durante a aquisição de uma amostra verificou-se que foram adquiridos 1800 eventos de linfócitos. As telas acima permitem algumas ações para tentar adquirir no mínimo 2000 eventos. Quais são as ações que elas permitem?



8. Em qual diretório está localizado o arquivo de exportação do resultados?



SEGURANÇA E SAÚDE NO LABORATÓRIO

Todos os funcionários do laboratório que frequentam a área técnica devem ser instruídos quanto ao uso de equipamentos/vestimentas de proteção abaixo:

- ✓ Luvas
- ✓ Óculos ou máscara de proteção
- ✓ Jaleco/avental de manga longa

Precauções Universais

- Após a manipulação de material contaminado, remova as luvas e lave bem as mãos com água e sabão.
- Realize a desinfecção da parte externa do equipamento e seus acessórios com hipoclorito 0,5%.
- Para prevenir a exposição a agentes biológicos perigosos, aplique água sanitária (10% do volume total) no conteúdo do recipiente de resíduos antes do descarte.
- É proibido fumar, comer, beber, manipular lentes de contato e pipetar qualquer material com a boca nas dependências da área técnica do laboratório.
- O reencape e/ou desconexão de agulhas é proibido. Todo o material perfuro-cortante deve ser descartado em recipiente adequado e devidamente identificado.

Descarte de Material Contaminado

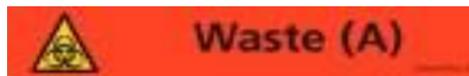
- O descarte de todo e qualquer material contaminado deve ser realizado em recipientes adequados e devidamente identificados com o símbolo de Risco Biológico.
- Tais recipientes devem se localizar a uma altura que permita a visualização da abertura.



Rotulagem Preventiva

Símbolo	Significado
	CUIDADO práticas em desacordo com as normas de segurança podem acarretar danos ao material, perda de dados e lesões leves ou graves ao operador
	Risco Elétrico
	Radiação Laser
	Risco Biológico

O tanque de esgoto oferece risco de exposição a doenças transmissíveis como AIDS, Hepatites B e C, entre outras. Por isso o mesmo deve ser rotulado:



Também é preciso evitar a exposição ao feixe de luz do laser devido à radiação emitida pelo mesmo. Mantenha as portas ópticas dos equipamentos devidamente fechadas, evitando vazamento de radiação.



Risco Químico

Os reagentes, controles e demais soluções utilizadas no preparo de amostras podem conter substâncias tóxicas. Deve-se utilizar os EPIs ao manipulá-los. Em caso de contato com mucosas, enxague abundantemente com água e procure, imediatamente, auxílio médico levando consigo o rótulo do produto.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas Manual de segurança e Limitações do equipamento.



PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS ROTINA CD4/CD8



CALIBRAÇÃO

1. Equipamentos

- ✓ Citômetro de fluxo BD FACSCalibur
- ✓ Vórtex

2. Materiais

- ✓ BD Calibrite™ 3 Beads
- ✓ BD Calibrite™ APC
- ✓ BD FACSCFlow™

3. Procedimento

Realizar os procedimentos de controle de qualidade do equipamento todos os dias em que a rotina for realizada. Este procedimento deve ser parte das recomendações do fabricante ou deve ser especificado pelo laboratório para estabelecer critérios **Pass/Fail** que verificam o desempenho do equipamento.

3.1. Preparação das partículas BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC

- a) Marcar um tubo 12 x 75 mm como tubo A e outro como tubo B.
- b) Passar o frasco de partículas BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC no vórtex para ressuspendê-las. Adicionar 1 ml de solução BD FACSCFlow™ no tubo A e 3 ml no tubo B.
- c) Utilizar a **Tabela 1** para preparar os tubos A e B

Tabela 1

Tipo de Ensaio	Tubo A	Tubo B
Four-color Lyse/No-Wash	Partículas não marcadas e APC	Partículas não marcadas, FITC, PE, PerCP e APC

- d) Adicionar uma gota de cada frasco de partículas BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC com base na informação de cada coluna. Tampar os tubos e misturar por inversão delicada ou passar no vórtex em baixa velocidade.

3.2. Entrar no Software BD FACSCComp™

- a. Selecionar o ícone BD FACSCComp™ na barra inferior da área de trabalho.
- b. Adicionar o nome ou iniciais do operador na tela **Sign In (Figura 1)**.



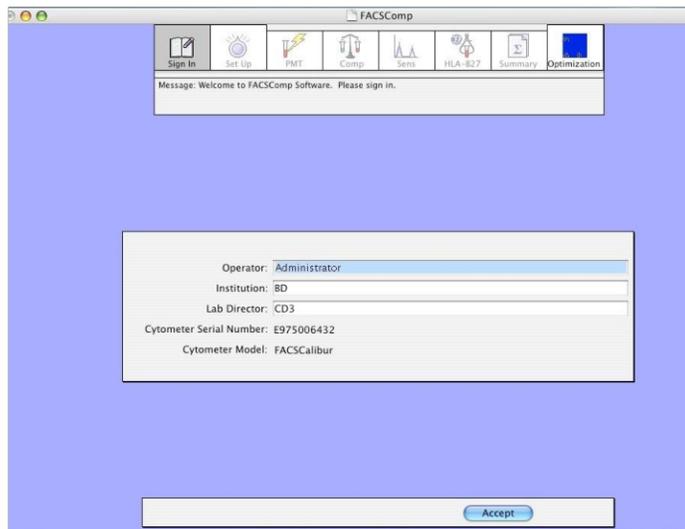


Figura 1: Tela **Sign In** do Software BD FACSComp™.

Clicar em **Accept**.

Clicar na opção **Lyse/No-Wash (LNW)** em **Assay Selection**. Verificar se as outras opções não estão selecionadas. Acrescentar o lote de identificação de cada partícula BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC. O lote de identificação das partículas, consistindo de cinco números e uma letra, encontra-se na etiqueta colante do kit BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC (etiqueta laranja para os valores de FITC, PE, *unlabeled* e PerCP e etiqueta azul para os valores de APC). Não adicionar espaço entre os números e a letra. Digitar a letra em maiúsculo (**Figura 2**).



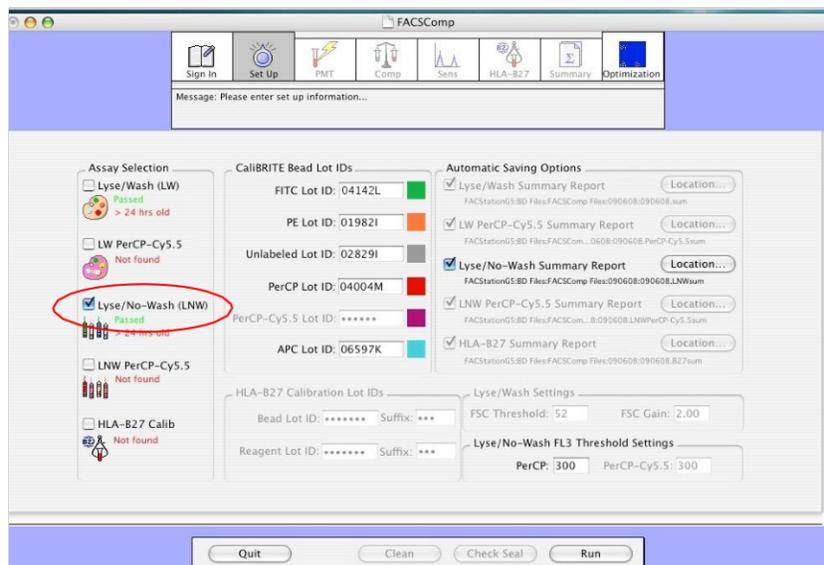


Figura 2: Tela Set Up do Software BD FACSComp™

3.3. Ajuste dos tubos fotomultiplicadores (PMTs)

- Homogeneizar delicadamente o tubo A e colocá-lo no citômetro.
- Ajustar a vazão do fluxo em **HI** e apertar o botão **RUN** no citômetro.
- Clicar em **Run** no menu do software e em seguida clicar em **Start** para iniciar a aquisição dos eventos.
- Se necessário**, o software irá informar que necessita de ajustes manuais, quando a taxa de eventos é menor que 400 eventos/seg ou quando o ajuste automático dos PMTs demorar mais que 75 segundos. Para ativar o modo manual, clicar no botão **Manual** na parte inferior da tela. A janela de valores alvos (**target values**) aparecerá. Utilizar a janela **Detectors/Amps** para ajustar os PMTs em ± 2 canais dos valores de referência para a fluorescência do PMT. Para SSC, ajustar o PMT em ± 5 canais dos valores alvos de compensação. O marcador de checagem não aparecerá durante o ajuste manual do PMT (**Figura 3**).



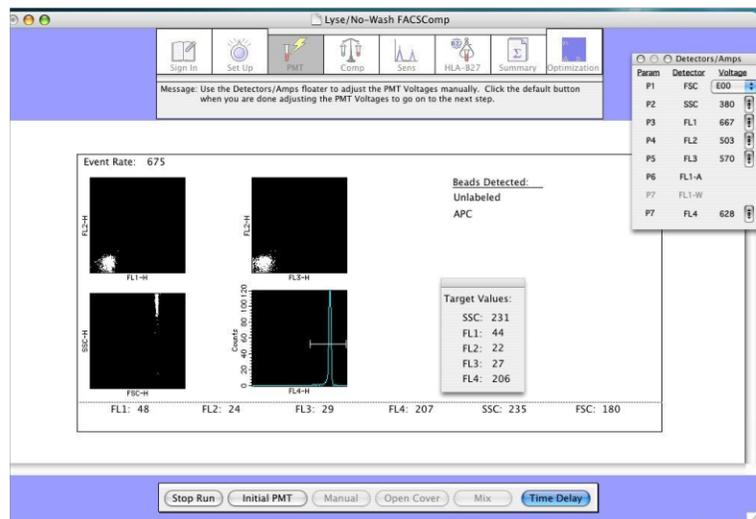
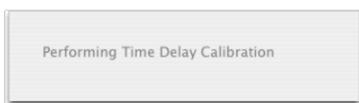


Figura 3: Ajuste dos tubos fotomultiplicadores (PMTs) utilizando o tubo A (partículas não marcadas e partícula APC). Observar o aparecimento da janela **Target Values** quando o botão **Manual** é clicado.

3.4. Calibração do **Time Delay**

- a. Se as partículas APC são detectadas, o software BD FACSCalibur™ irá realizar automaticamente a verificação do **time delay**. Se a verificação é bem sucedida, a janela de compensação aparecerá. Se a verificação não é bem sucedida, você terá 5 segundos para decidir como proceder. Você poderá escolher tentar novamente o **time delay**, repetir o ajuste inicial do PMT ou continuar a compensação.



Mensagem indicando a realização do Time Delay



Mensagem indicando que o Time Delay foi realizado com sucesso



3.5. Ajuste da Compensação

- a. Remover o tubo A do citômetro
- b. Homogeneizar delicadamente o tubo B e colocá-lo no citômetro.
- c. Clicar em **Start** para iniciar o ajuste da compensação.
- d. O software BD FACSComp™ ajusta os valores de compensação apropriados até que a diferença média alvo seja alcançada. Quando a compensação está ajustada, os marcadores de checagem aparecem e surgirá a mensagem **Compensation Set Successfully (Figura 4)**. O software espera 5 segundos, permitindo a interrupção antes que automaticamente apareça a tela de teste da sensibilidade.

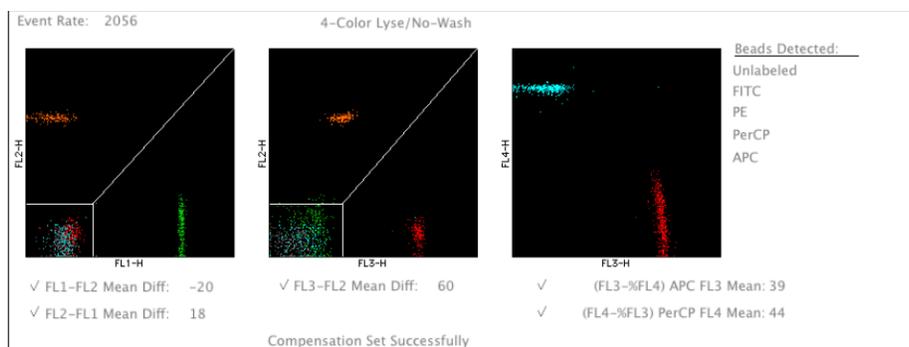


Figura 4: Ajuste da compensação.

- e. **Se necessário**, o software irá informar que necessita de ajustes manuais. Para ativar o modo manual, clicar o botão **Manual** na parte inferior da janela. A caixa de diálogo **Target Values** aparecerá. Utilizar a janela de compensação para ajustar a compensação manualmente (**Figura 5**). As diferenças médias são mostradas embaixo dos gráficos. Estes valores devem ser menores que ± 2 canais em relação aos valores alvos.



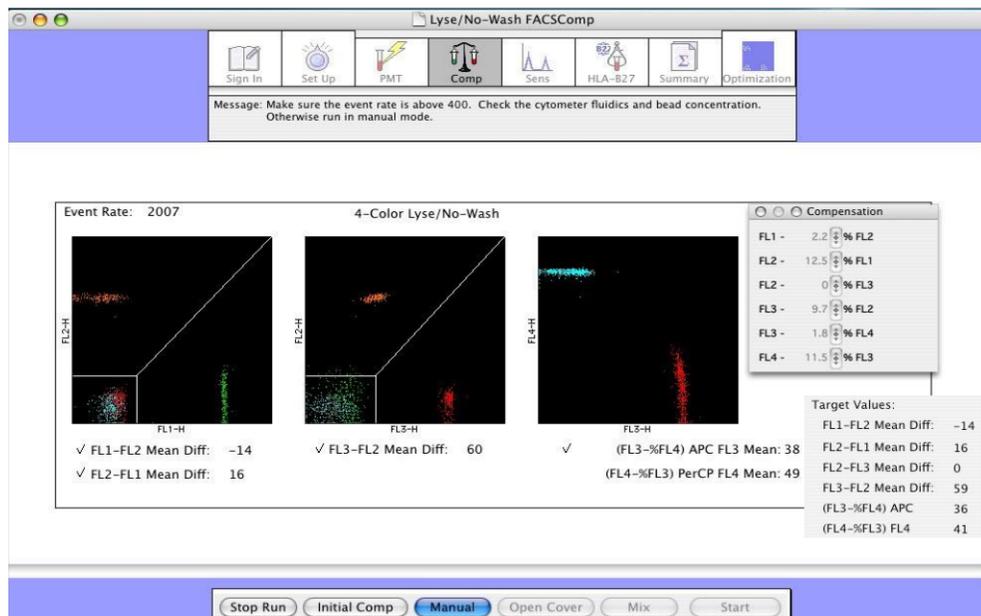


Figura 5: Tela de ajuste manual dos valores de compensação no software BD FACSComp™.

3.6. Teste de Sensibilidade

- Após a compensação ser ajustada de forma bem sucedida, aparecerá a tela de Teste de Sensibilidade.
- Deixar o tubo B no citômetro enquanto o teste de sensibilidade é realizado. O teste de sensibilidade consiste em três diferentes testes: o teste de sensibilidade das fluorescências (Figura 6), o teste de sensibilidade do detector **side scatter** (Figura 7) e o teste de sensibilidade do detector **forward scatter** (Figura 8).



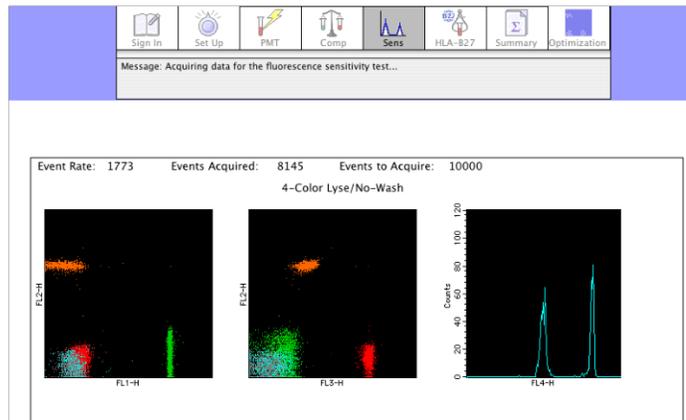


Figura 6: Tela do teste de sensibilidade das fluorescências.

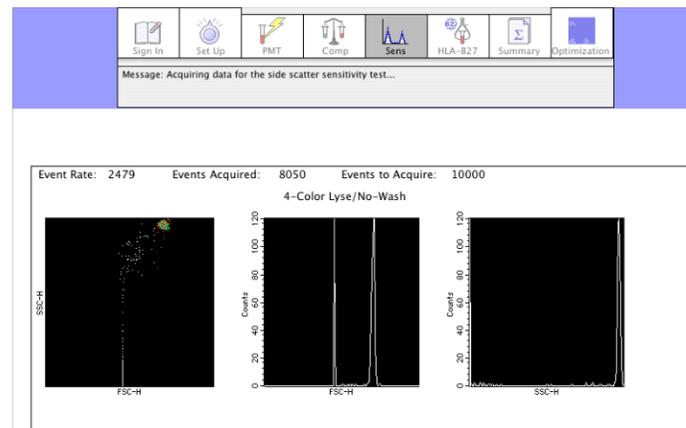


Figura 7: Tela de teste de sensibilidade do detector side scatter.



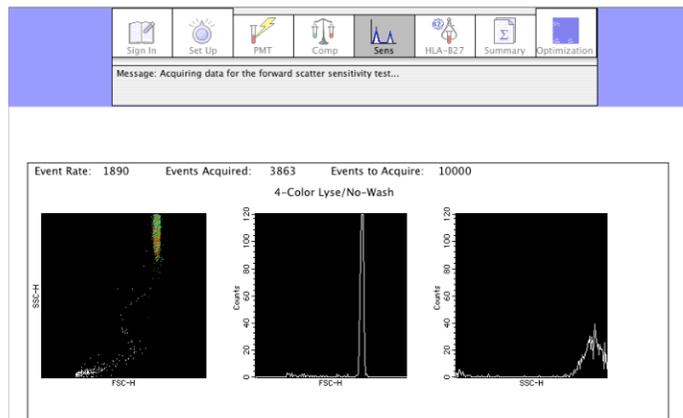


Figura 8: Tela do teste de sensibilidade do detector **forward scatter**.

- c. Remover o tubo com partículas BD Calibrite™ 3 Beads e BD Calibrite™ APC e colocar um tubo com água destilada no citômetro e selecionar

Standby no painel de controle do citômetro.

3.7. BD FACSCComp™ Report



Após o término do teste de sensibilidade, aparecerá a tela do **Summary Report (Figura 9)**. Na tela **Summary**, o BD FACSCComp™ mostra o relatório dos valores dos detectores, da compensação e do resultado do teste de sensibilidade. Certificar-se que todos os parâmetros passaram. Caso algum deles tenha falhado (no resultado aparecerá **Fail**) repetir todos os passos ou ligar para a BD. O laudo final da calibração deve se encaixar nas condições mostradas abaixo:

- ✓ Todos os parâmetros (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 e FL4) devem **passar no teste de sensibilidade (Pass)**;
- ✓ A potência do laser azul (*blue laser power*) **DEVE ser igual a 14,5 ±0,5 mWatts**;
- ✓ Os valores de compensação **DEVEM ser menores que 50%**;
- ✓ O resultado da calibração do **Time Delay deve ser Pass** (“Time Delay calibration passed”).

Se todos os pontos do FACSCComp Report estiverem de acordo com as recomendações acima, Clicar em **Set Up** e, posteriormente, em **Quit** para sair do software BD FACSCComp™.



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™

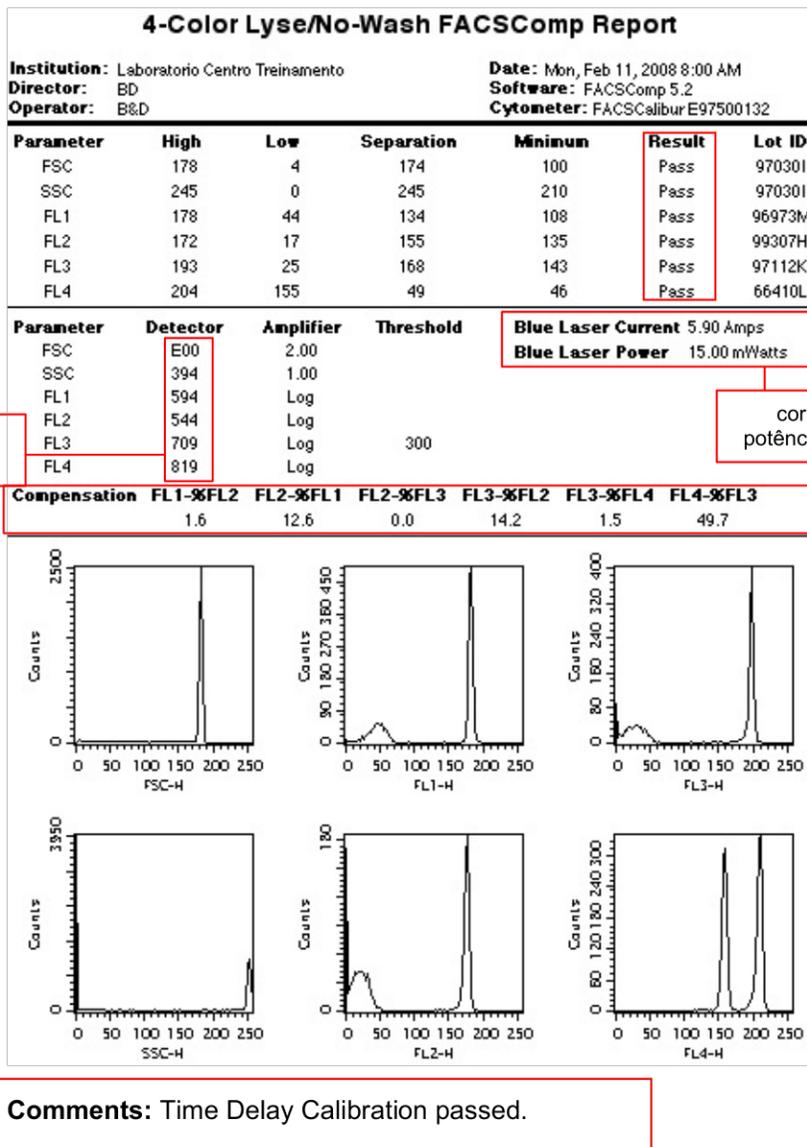


Figura 9: BD FACSComp™ Report.



PREPARO DE AMOSTRAS E CONTROLES

1. Equipamento

- ✓ Pipetas e ponteiros para pipetar volumes de 20 µL, 50 µL e 450 µL.
- ✓ Vórtex

2. Materiais

- ✓ Sangue total periférico
- ✓ Solução de lise (BD FACS™ Lysing Solution solution) - Diluir a solução 10X concentrada 1:10 com água deionizada e armazenar a temperatura ambiente (20°C a 25°C). A solução preparada é estável por 1 semana quando armazenada em frasco de vidro ou polietileno de alta densidade
- ✓ Material de Biossegurança: luvas, óculos de proteção, jaleco de manga longa e recipiente para descarte de material contaminado
- ✓ Reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC
- ✓ BD Trucount™ Absolute Count Tubes
- ✓ Reagente BD Trucount™ Control Beads

3. Procedimento (Amostras)

- a. Identificar os BD Trucount™ Absolute Count Tubes com o número de identificação da amostra.



Verificar se o *pellet* de partículas BD Trucount™ Absolute Count Tubes está intacto e se está sob a grade de metal no fundo do tubo antes de utilizá-lo. Caso o tubo apresente algum tipo de problema, descartá-lo e utilizar outro.

- b. Pipetar 20 µL do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC utilizando a pipeta P20 e uma ponteira de 20-200 µl sem filtro. Dispensar o volume na lateral do tubo um pouco antes do retentor metálico, sem tocar o pellet de esferas. Trocar a ponteira quando ocorrer bolhas ou encostar nas partículas (*beads*) no fundo do tubo (resultados práticos demonstraram que a ponteira é trocada em média a cada 5 pipetagens). Observar atentamente a ocorrência de bolha ou se o volume aspirado está incorreto, dispensar o reagente imediatamente acima da grade de metal. Não encostar no *pellet* de partículas Trucount.



- c. A pipetagem do volume preciso de sangue total é crítica. **Utilizar a técnica de pipetagem reversa**, que consiste em pressionar o botão até o segundo estágio. Quando o botão é liberado, ocorrerá a aspiração de um excesso de amostra na ponteira. Um volume preciso de amostra é expelido pressionando-se o botão até o primeiro estágio, deixando o excesso da amostra na ponteira. A pipetagem deverá ser feita utilizando a pipeta P200 e uma ponteira de 20-200 µl com filtro; descartar a ponteira a cada pipetagem. Dispensar 50 µL de sangue total homogeneizado imediatamente acima da grade de metal.



Evitar respingar sangue na parede do tubo. Se o sangue permanecer na parede do tubo, esta porção não será marcada com o reagente.

- d. Tampar o tubo e colocar no vórtex em baixa velocidade para homogeneizar a amostra.
- e. Incubar por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente (20°– 25°C).
- f. Adicionar ao tubo 450 µL de solução de lise diluída 1:10 em água destilada. A pipetagem deverá ser feita com a pipeta de repetição e uma seringa de 12,5mL (utilizar um aeringa por dia de rotina). Tampar o tubo e colocar no vórtex em baixa velocidade para homogeneizar a amostra.
- g. Incubar por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente (20°C-25°C). A amostra agora está pronta para ser analisada no citômetro de fluxo.



O sangue não coagulado deve ser armazenado a temperatura ambiente (20°– 25°C) e deve ser processado em até 48 horas após a coleta. Após processamento, as amostras devem ser analisadas no citômetro em até 24 horas após o preparo, desde que armazenadas em temperatura ambiente e no escuro.

NÃO ESQUECER!!! As incubações devem ocorrer no escuro e à temperatura ambiente.



3.1. Procedimento (Controles)

Os controles são preparados em três tubos identificados como baixo, médio e alto e devem ser adquiridos antes das amostras. Pode ser utilizada para o preparo dos controles amostra de um doador hematologicamente normal.

A primeira etapa do preparo é feita da mesma forma que as amostras. A segunda etapa acontece após a incubação de 15 minutos com a solução de lise, quando devemos adicionar 50 µL (**por pipetagem reversa**) de partículas controle LOW no tubo identificado como BAIXO, 50 µL de partículas controle MEDIUM no MÉDIO e 50 µL de partículas HIGH no ALTO.

Agitar as amostras completamente para ressuspender as partículas e reduzir a agregação celular antes de passá-las no citômetro de fluxo.

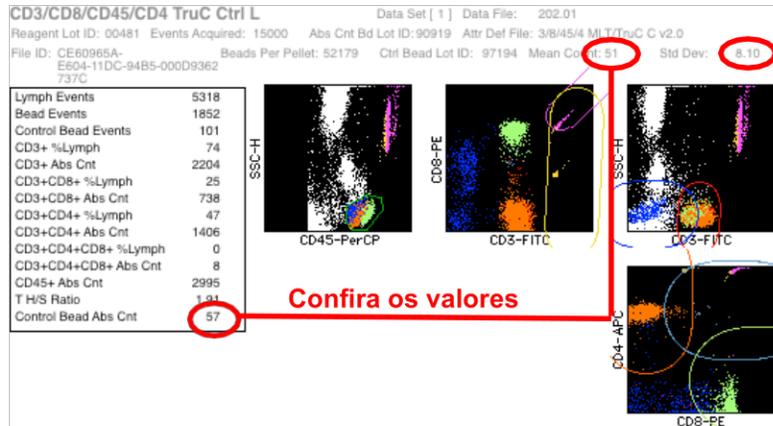


O rótulo da caixa de partículas controle contém faixas de valores esperados (Valor \pm S.D.) para os controles ALTO, MÉDIO e BAIXO. Essas faixas de valores variam de lote para lote. Se os valores obtidos estão fora da faixa esperada, suspeitar de imprecisão na pipetagem, erros no procedimento ou problemas com os BD Trucount™ Absolute Count Tubes.

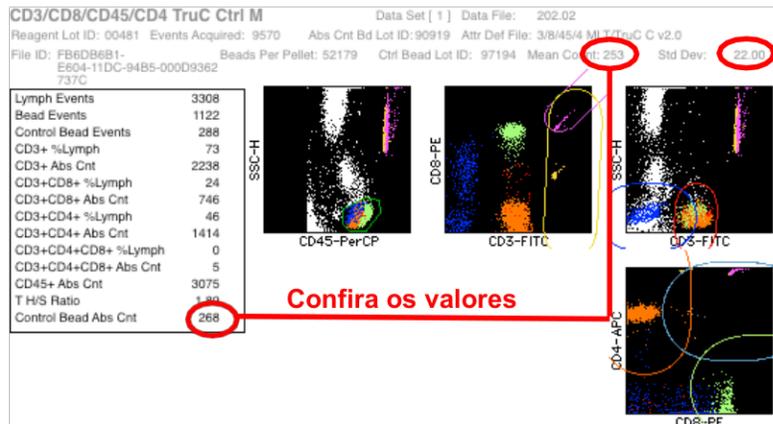


Quantificação de linfócitos T CD4/CD8 BD FACSCalibur™

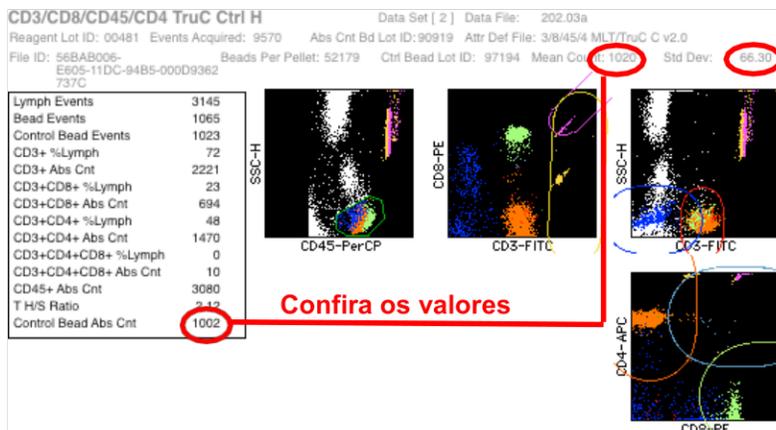
Leitura do Controle Baixo



Leitura do Controle Médio



Leitura do Controle Alto



AQUISIÇÃO E ANÁLISE DAS AMOSTRAS - BD MULTISSET™

1. Setup do Software BD Multiset™

- 1.1. Preencher com o nome ou iniciais do operador.
- 1.2. Clicar em **Accept**. A tela **Set Up** irá aparecer.
- 1.3. Verificar as seguintes seleções na tela **Set Up (Figura 1)**.

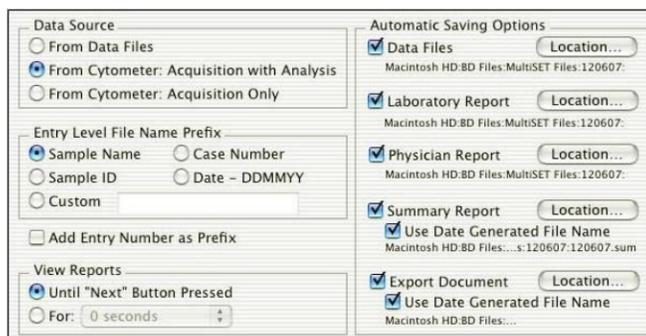


Figura 1: Tela Set Up do Software BD Multiset™



Modos de aquisição e análise dos dados:

From Data Files: para analisar amostras adquiridas anteriormente ou caso queira reanalisar alguma amostra.

From Cytometer: Acquisition with Analysis: para processar amostras e analisá-las automaticamente após a aquisição.

From Cytometer: Acquisition Only: para processar amostras e analisá-las posteriormente.

1.4. Clicar no botão **Accept** na tela **Set Up**. A janela **BD FACSComp™** irá aparecer.

1.5. Clicar em **Launch BD FACSComp™**. Selecionar **Skip BD FACSComp™** faz com que o software vá para a próxima tela.

2. Test Preferences

2.1. A janela **Test Prefs** aparecerá após o término do BD FACSComp™ (**Figura 2**).

2.2. Verificar se os parâmetros corretos estão selecionados na janela **Test Prefs** ou deixar os parâmetros pré-determinados (todas as opções selecionadas).

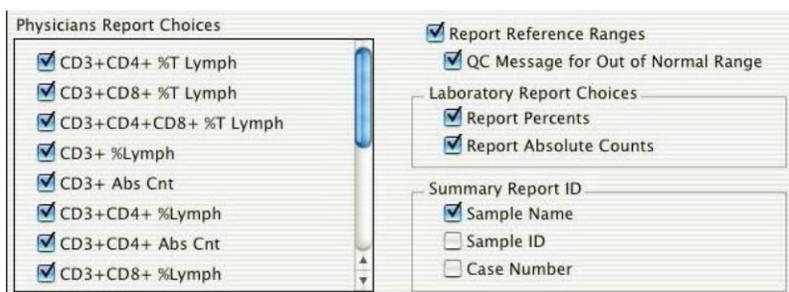


Figura 2: Tela Test Prefs.

2.3. Clicar em **Lot IDs**.

2.3.1. Clicar no ícone **Absolute Count Beads** (**Figura 3**) e adicionar os valores de **lot ID** e **beads/pellet** presentes na etiqueta da embalagem metálica contendo os BD Trucount™ Absolute Count Tubes **É importante colocar corretamente os valores do lot ID e da contagem de partículas para obter resultados precisos.**



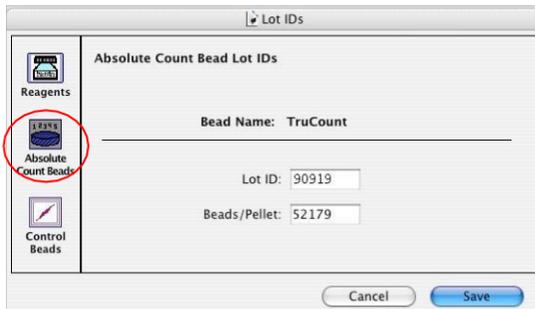


Figura 3: Tela Absolute Count *Beads* no ícone Lot IDs.

2.3.2. Clicar em **Reagent Lot ID** (Figura 4). Colocar o número do lote do reagente.

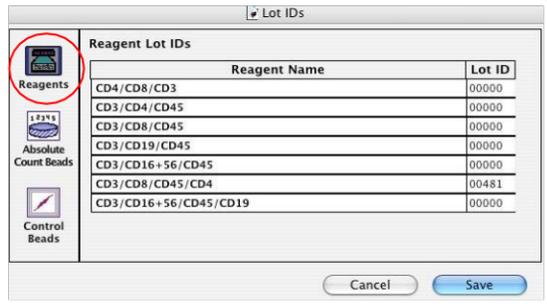


Figura 4: Tela Reagents no ícone Lot IDs.

2.3.3. Clicar em **Control Beads**. Adicionar o número de *beads* e o desvio padrão (SD) de cada um dos níveis de partículas BD Trucount™ Control Beads. Estes números estão descritos na caixa do BD Trucount™ Control Beads.



2.3.4.

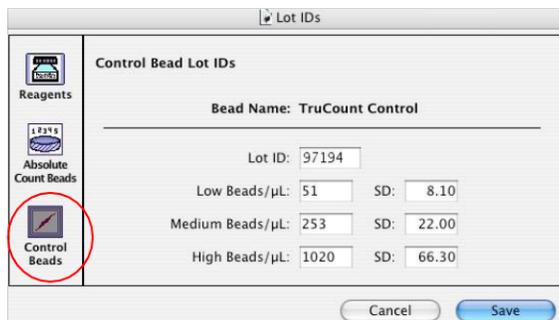


Figura 5: Tela Control Beads no ícone Lot IDs.

2.3.4. Clicar em **Save**

3. Utilizando Instrument Settings

3.1. Clicar em **Cytometer**

3.2. Abrir o menu **Instrument Settings**

3.3. Clicar em **Open**

3.4. Abrir a pasta **Instrument Settings Files**

3.5. Procurar o arquivo **CalibFile.LNW**. Clicar em **Open, Set e Done** (Figura 6).

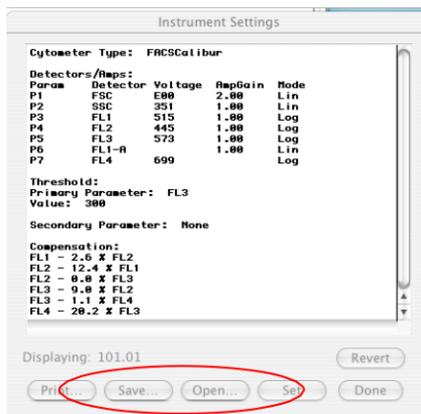


Figura 6: Tela Instrument Settings



4. Preenchendo as Informações Sobre as Amostras e Painéis

4.1. Clicar em **Accept** para continuar na janela de amostras.

4.2. Clicar no campo **Sample Name** e adicionar um nome para a amostra controle. Clicar na coluna **Panel Name** e selecionar no menu o painel apropriado para o reagente utilizado. **O painel para se correr o controle BD Trucount™ Control Beads é o CD3/CD8/CD45/CD4 Control.** Deve-se digitar o controle apenas uma única vez, pois quando este painel é selecionado subentende-se que serão adquiridos os três tubos com partículas controles em concentrações diferentes (*Low, Medium e High*).

4.3. Digitar as amostras dos pacientes nas linhas subsequentes. Geralmente, o painel utilizado para o reagente CD3 /CD8/CD45/CD4 com os BD Trucount™ Absolute Count Tubes é o ROTINA 4 CORES. Se este painel não foi criado no seu laboratório, consulte o último tópico (Criando Painéis)

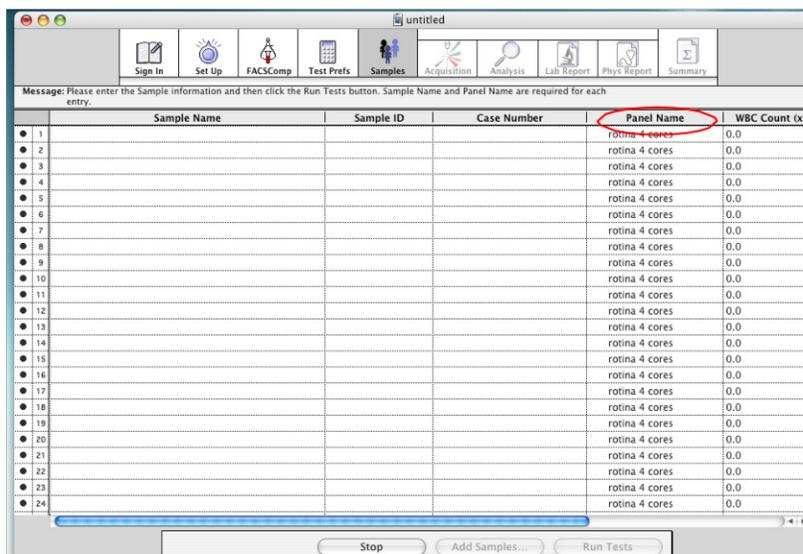


Figura 7: Tela Samples.

4.4. Selecionar o mesmo painel no menu para as amostras adicionais.

4.5. Selecionar **File > Save**.

4.6. Nomear o arquivo com a data e selecionar a pasta de destino.

4.7. Clicar em **Save**.



5. Fixando o Painel

5.1. Fixar o painel quando os parâmetros para análise forem iguais para todas as amostras. Mesmo quando o painel é fixo, é possível modificar o painel para uma determinada amostra na coluna **Panel Name**. Por exemplo, pode-se fixar o painel Rotina 4 cores e alterar o painel apenas para as amostras do controle baixo, médio e alto do BD Trucount™ Control Beads.

5.2. Para fixar o painel, selecionar **BD Multiset™ > Preferences > Panels**. Clicar em **Run Fixed Panel** e selecionar algum painel pré-existente (**Figura 8**).

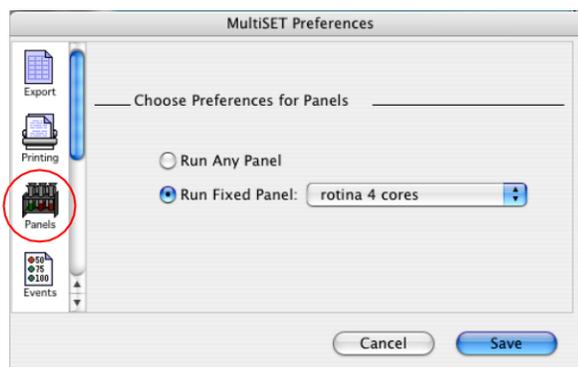


Figura 8: Tela Panels em BD Multiset™ Preferences

6. Aquisição das Amostras

6.1. Deve-se adquirir no mínimo 2.000 eventos de linfócitos totais em um total de 20.000 eventos. Caso não seja adquirido 2.000 eventos de linfócitos totais após a aquisição de 20.000 eventos, o software BD Multiset™ continua adquirindo até atingir o máximo de 100.000 eventos. O número mínimo de linfócitos a ser adquirido está determinado no ícone **Reagent Tools** da tela **Test Prefs** (**Figura 9**). Este é um ícone de consulta onde pode-se verificar os valores determinados para o reagente de escolha, neste caso o tipo de reagente é BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC TruC (indica que o BD Trucount™ Absolute Count Tubes é utilizado com este anticorpo monoclonal). O número de linfócitos adquiridos está determinado em **Acquisition Target Info > Lymph > Min Events to Acquire: 2000**.



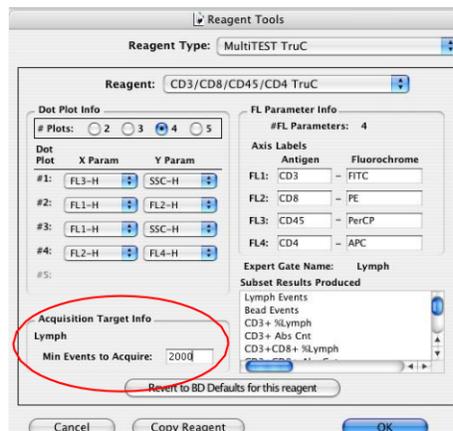


Figura 9: Ícone Reagent Tools da tela Test Prefs.

O número total de eventos a ser adquirido (20.000 eventos) e o número máximo (100.000 eventos) a ser adquirido caso não se atinja ao valor mínimo de 2.000 linfócitos está determinado em **BD Multiset™ > Preferences > Events** (Figura 10). Deixar selecionada a opção **Acquire Until Total Events Collected: 20.000**.

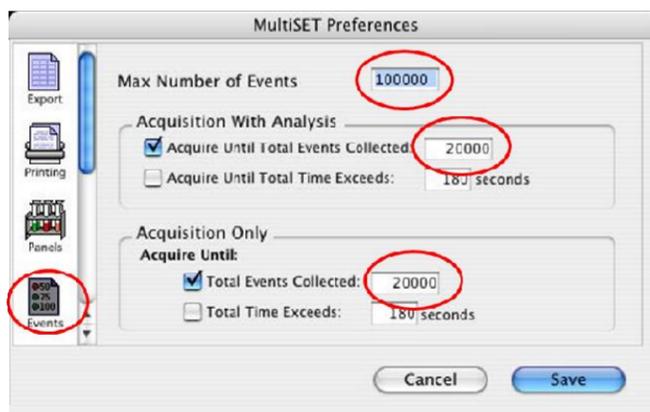


Figura 10: Tela Events em BD Multiset™ Preferences.

- 6.2. Passar no vórtex o primeiro tubo do controle e colocá-lo no citômetro.
- 6.3. Verificar se os botões **RUN** e **HI** estão selecionados no painel de controle.
- 6.4. Clicar em **Run Tests**.
- 6.5. Verificar o aparecimento dos dados da amostra (Figura 11).



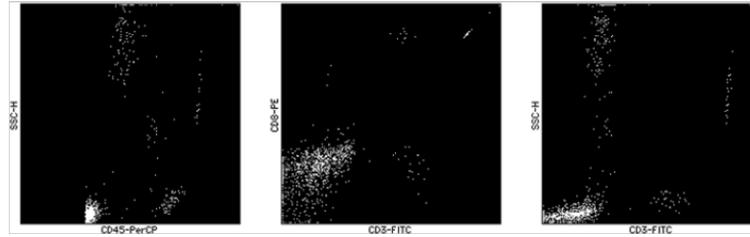


Figura 11: Início da aquisição de eventos no BD Multiset™.

6.6. Clicar em **Acquire**. A fase de aquisição é iniciada.

6.7. Quando a aquisição é finalizada, remover o tubo do citômetro. Em seguida, aparecerá o **Laboratory Report**.

6.8. Clicar em **Pause**.

6.9. Avaliar os gráficos. As posições dos gates, attractors e populações celulares devem aparecer de forma semelhante ao gráfico a seguir (**Figura 12**).

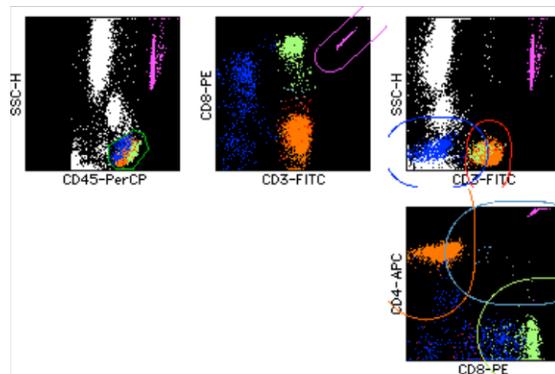


Figura 12: Gráficos apresentados no Laboratory Report.



O gate ou os attractors podem ser ajustados logo após a análise da amostra adquirida. Qualquer alteração realizada no gate ou attractors é aplicada apenas à amostra atual. Para mover um attractor, arrastar o ponto central para a posição desejada. Para alterar a orientação e comprimento, arrastar um dos dois pontos das extremidades. Para alterar o tamanho de um attractor, arrastar a borda de um attractor para torná-lo mais comprido ou mais amplo.

6.10. Clicar em **Analyze**. Isto confirma as alterações e faz um novo cálculo dos resultados. Uma mensagem aparecerá na área **QC Message** do **Lab Report** indicando que foi feito um gate manual. Se necessário, salvar estas alterações selecionando **File > Save**. Continuar adquirindo e analisando as amostras restantes.

6.11. Passar o próximo tubo no vórtex e colocá-lo no citômetro.

6.12. Clicar em **Acquire** para iniciar novamente a aquisição de dados. Continuar a aquisição e análise de todas as amostras.

6.13. Todos os gráficos devem ser inspecionados. Fazer as alterações apropriadas nos gráficos do BD Multiset™. Se necessário, preparar novamente ou adquirir pela segunda vez a amostra do paciente para uma nova análise.

6.14. Os laudos **Laboratory Report** e **Physician Report** serão disponibilizados e impressos em seguida. Estes laudos devem ser inspecionados para garantir a precisão dos resultados.

6.15. Quando a última amostra for analisada, aparecerá a janela do **Summary Report**. O laudo **Summary Report** contém uma lista de todas as amostras no **Schedule document**. Os campos desta janela não podem ser editados.

6.16. Após a aquisição da última amostra, colocar um tubo com água destilada na agulha de sucção da amostra e colocar o equipamento em standby.

6.17. Clicar em **Quit** para sair do software BD Multiset™.

6.18. Realizar o procedimento de limpeza após aquisição para proceder o desligamento do citômetro de fluxo BD FACSCalibur™.





Caso tenha adquirido amostras anteriormente no mesmo dia ou o número de pacientes cadastrados tenha sido maior que 99, selecionar **Data File** e clicar em **Location**. Escolher o arquivo **BD Multiset™ Files** e clicar em **New folder** – colocar a data atual e uma letra ou um nome para diferenciar da pasta anterior. Clicar em **Create** e **Choose**. Escolher a pasta criada para os relatórios seguintes abrindo **Location** e selecionando a pasta criada e clicando em **Choose**. No final clique sobre **Accept**.

7. Impressora

7.1. Para habilitar ou desabilitar a impressão do laudo, procurar na barra **BD Multiset™** superior e clicar na seqüência: **Preferences > Printing > Never** (para desabilitar a impressão) ou **After each entry** (para habilitar a impressão após cada análise) > **Save** (Figura 13).

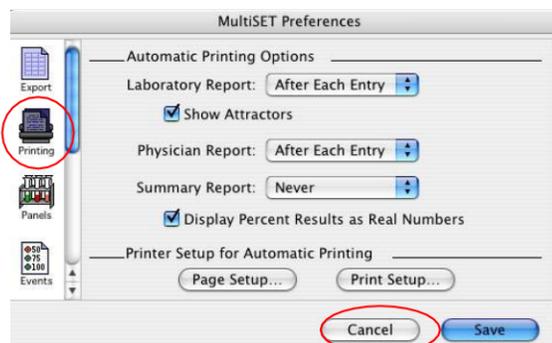


Figura 13: Configuração da impressora para habilitar ou não a impressão dos laudos.

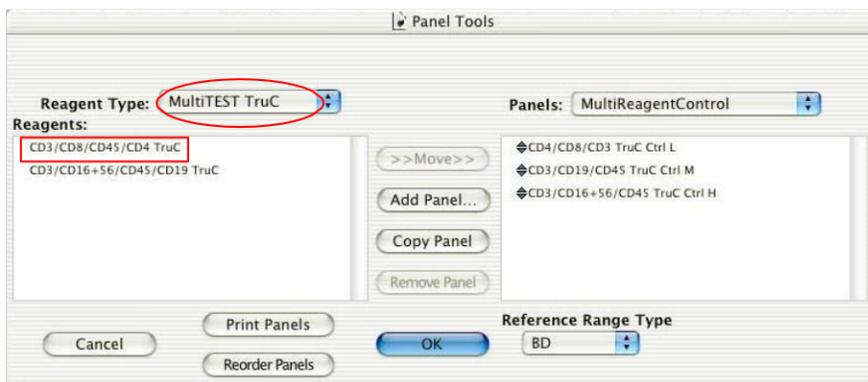
8. Criando Painéis

Os passos a seguir fornecem um exemplo de procedimento para criar o painel **4-color CD4 TruC** para o reagente CD3/CD8/CD45/CD4 TruC.

8.1. Selecionar **Tools > Panel Tools**.



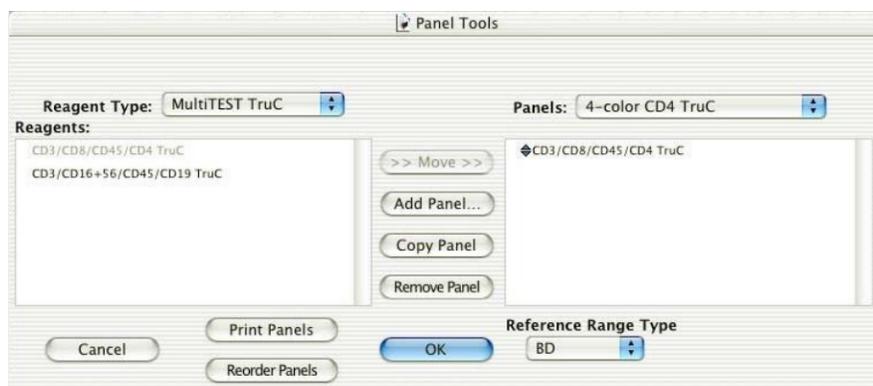
8.2. Selecionar **BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC TruC** no menu **Reagent Type** no lado esquerdo da tela e selecionar **CD3/CD8/CD45/CD4 TruC** na lista abaixo deste menu.



8.3. Clicar em **Add Panel** e nomear o painel como **4-color CD4 TruC**.



8.4. Selecionar um reagente da lista de Reagentes, clicar em **Move** e em seguida clicar em **OK**.



GERENCIAMENTO DE ARQUIVOS

Cada amostra ao final da sua aquisição no MutiSET, ganha os arquivos abaixo:

- .01 – FCS File (arquivo de citometria, passível de ser aberto em qualquer software de análise para reanálise)
- .lab – Lab Report (arquivo que contém os gráficos)
- .phy – Physicyan Report (arquivo sem gráficos, com valores celulares e com intervalos de referência)

Ao final de cada rotina, a pasta do dia em que a rotina está sendo salva ganha os arquivos abaixo:

- .exp – Arquivo utilizado na exportação dos resultados para o SISCEL
- .sum – Arquivo resumo da rotina

EXPORTAÇÃO DE RESULTADOS PARA O SISCEL

Para se realizar a exportação dos dados:

1. No diretório **FACStation > BD Files > BD Multiset™ Files > Pasta do dia**, busque o arquivo de exportação que estará nomeado com a **DATA DO DIA.exp**
2. Com um pendrive posicionado no computador, copie o arquivo da pasta e cole no pendrive.
3. Leve o pendrive para o computador onde o programa SISCEL está instalado e faça o interfaceamento seguindo o procedimento operacional padrão para exportação de dados que você tem no laboratório (enviado pelo Ministério da Saúde).



MATERIAL ADICIONAL



Arquivos LJ Levey Jennings	Tipo: Procedimento Operacional Padrão	Data: 11/10/2013
		Número: 01
	Título: Utilização de arquivos LJ	Revisão: A
		Páginas: 1 a 16

1. PROPOSTA

Este documento especifica o processo de utilização de arquivos LJ (BD FACSComp™) na rotina de quantificação de linfócitos CD4/CD8, realizada pelos laboratórios que fazem parte da rede do Ministério da Saúde.

2. ESCOPO

O documento fornece as instruções necessárias para se:

- Acompanhar a linearidade instrumental (BD FACSCalibur™)

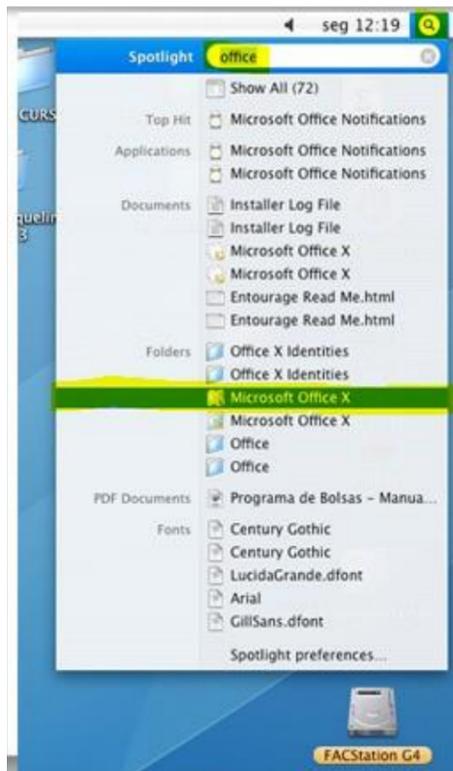
3. Acompanhar a linearidade instrumental

Utilizando o software BD FACSComp™ é possível acompanhar a linearidade instrumental de 30 ou 60 calibrações para os parâmetros (FSC, SSC, FL1, FL2, FL3 e FL4) e ainda salvar o arquivo contendo os dados da forma que desejar. Para realizar essa tarefa siga os procedimentos apresentados abaixo para a importação do arquivo Levey- Jennings gerado automaticamente pelo software BD FACSComp™.

Instruções para a importação de arquivos Levey-Jennings - BD FACSCOMP™

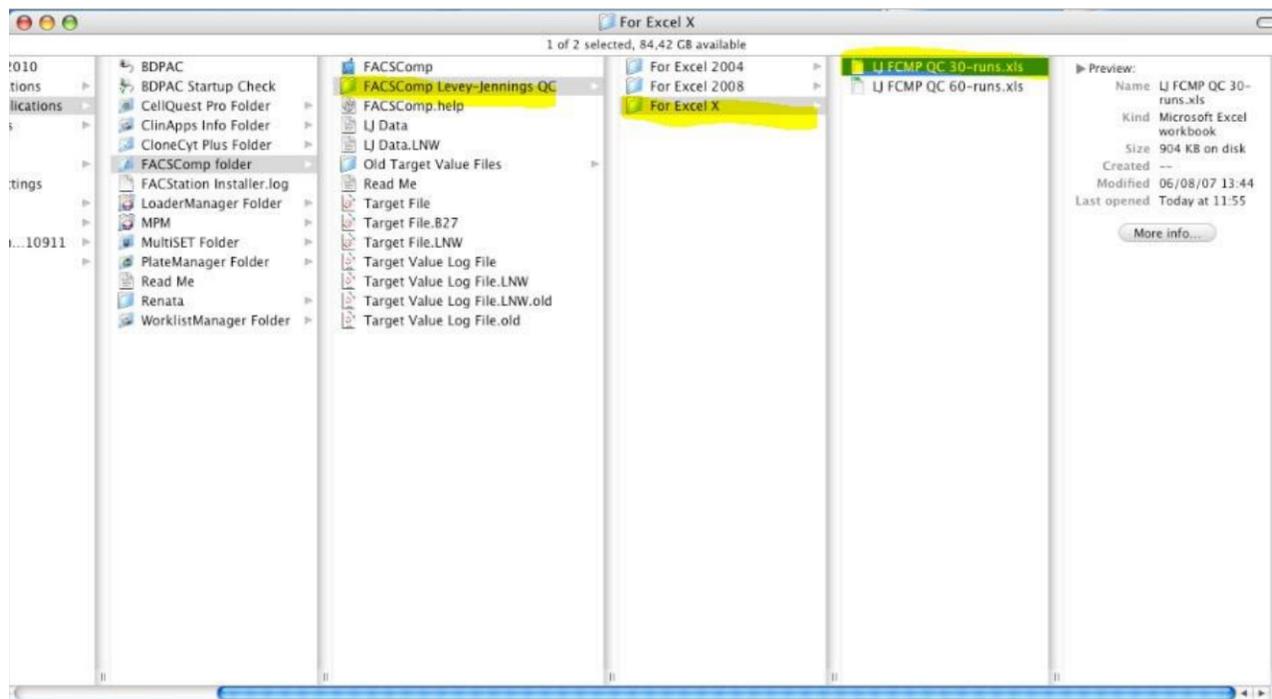
- Para ter acesso a esse arquivo você precisará que o pacote office esteja habilitado no computador do citômetro.
- Verifique a versão do Excel que está instalado no seu computador. Para isso, na área de trabalho do computador, clique na **lupa** no canto superior direito da tela e digite **Office**. Aparecerá uma tela logo abaixo da lupa quando você digitar. Em **Folders** verificar em Microsoft Office qual é o escrito que aparece na frente. Pode ser: **Microsoft X**, **Microsoft 2004** ou **Microsoft 2008** ou **alguma versão mais atual**.





- Coloque a pasta **BD FACSComp™ Levey-Jennings QC**, que você recebeu no pendrive da Jornada, no diretório **FACStation > BD Applications > BD FACSComp™ Folder**.
- Abra o arquivo de Excel “LJ FCMP QC 30-runs.xls” que está localizado em **FACStation > BD Applications > BD FACSComp™ Folder > BD FACSComp™ Levey-Jennings QC > Escolher a pasta referente a versão do Excel que você acabou de verificar**. No nosso exemplo a versão do Excel é X.





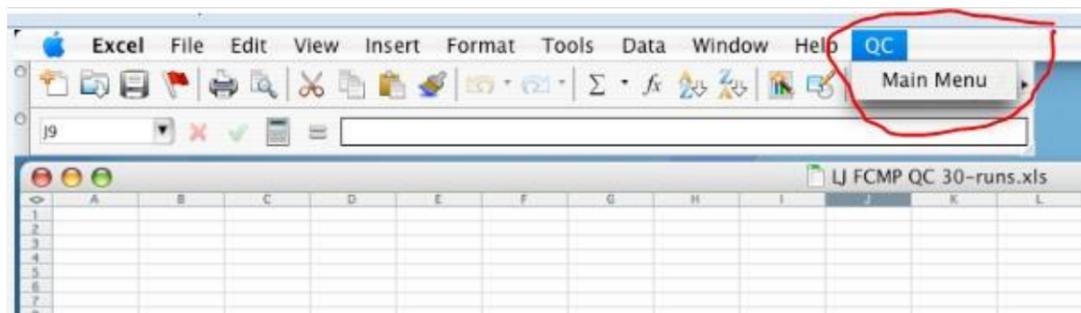
- Automaticamente se abre uma janela onde se deve clicar em **Enable Macros**;



- Pressione *Ok* na janela Disclaimer.



- Na barra de ferramentas do arquivo em excel selecionar **QC** e **Main Menu**.



- Na janela Main Menu selecionar:
 - ✓ Software version: *BD FACSComp™ 4.x*
 - ✓ Parameters to Chart: *FSC,SSC,FL1,FL2,FL3 e FL4*
 - ✓ Reports to Print: deixar tudo selecionado





- Pressionar **Import Data**, onde se abre uma janela de localização do arquivo LJ. O mesmo pode ser encontrado no diretório:

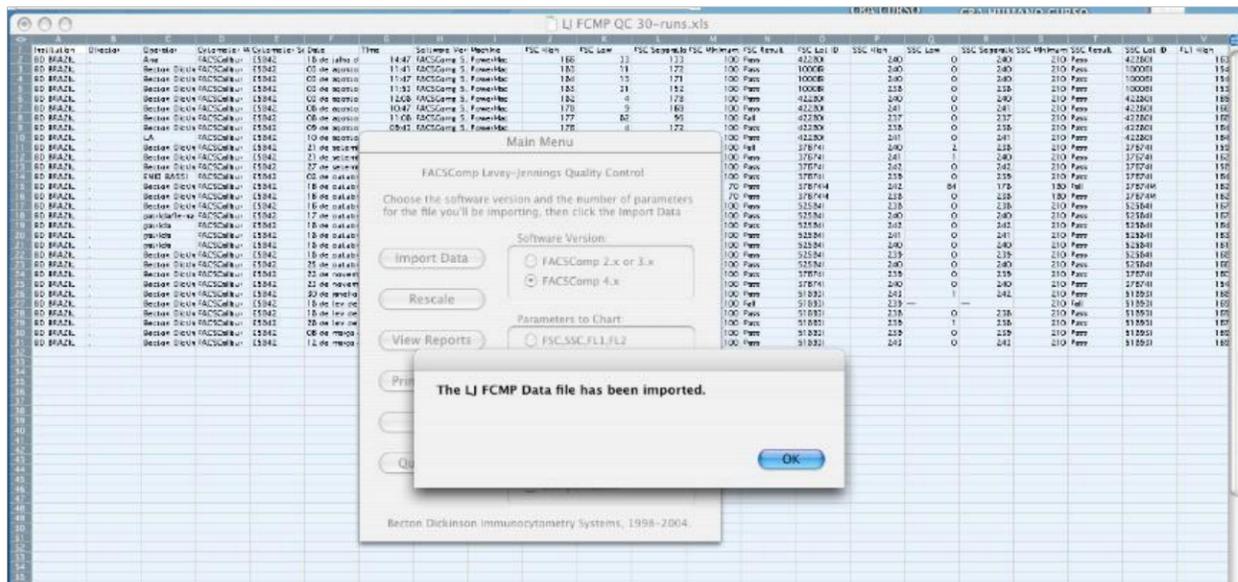
FACStation > BD Applications > BD FACSComp™ Folder > LJ Data.LNW





- Abrirá uma janela de 3 passos, pressionar:
 1. *Next*
 2. *Next*
 3. Column Data Format: **DATE**, e *Finish*
- Aparecerá um aviso que o arquivo foi importado com sucesso.





- Na janela **Main Menu** pressionar **Rescale**, ação que demora alguns segundos, mas quando a ação for finalizada, aparece uma mensagem de aviso.
- Verificar se os dados importados estão corretamente distribuídos.
- Para finalizar, salvar uma cópia do Excel com os arquivos importados clicando em Save as:
 - Diretório: Data > Programa HIV > Estatísticas > BD FACSComp™
 - File Name: nome de escolha (ex: “QC Out-Nov 13.xls”)
- Agora você tem resultados referentes a linearidade do seu instrumento. Qualquer dúvida na interpretação dos mesmos, favor entrar em contato com o suporte científico da BD Biosciences, através do e-mail suporte.cientifico@bd.com ou pelo telefone 0800 771 7157 ou pelo Telegram Atendimento BD Brasil. As informações contidas nessa seção podem ser encontradas no Capítulo 4: Controle de qualidade do equipamento, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™,



GUIA DE PIPETAGEM REVERSA

Protocolo: Quantificação de Linfócitos T CD4/CD8	Tipo: Guia	Identificação: BDB_MoH 01
	Título: Técnica de Pipetagem Reversa	Revisão:
		Páginas: 1 de 5

1. Objetivo

Detalhar a técnica de pipetagem reversa para a preparação de amostras de sangue periférico.

2. Escopo

Este guia é direcionado aos laboratórios clínicos que realizam a quantificação de linfócitos T CD4 por citometria de fluxo utilizando sangue periférico.

3. Referências

3.1. *Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. Cytometry, 42:327-346, referência 13.*

4. Equipamento

- 4.1. Pipeta manual ajustável
- 4.2. Ponteiras
- 4.3. Tubo teste vazio

5. Materiais

- 5.1. Sangue periférico, bem homogeneizado, coletado em tubos EDTA K2 ou K3 (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
- 5.2. Materiais de biossegurança
 - 5.2.1. Luvas
 - 5.2.2. Óculos de proteção



5.2.3. Avental

5.2.4. Descarte para material biológico

7. Procedimento

A pipetagem reversa é a técnica recomendada para pipetar soluções viscosas, que possuem tendência a formar espuma, ou requerem a dispensa de pequenos volumes. O modo reverso só é possível com pipetas de deslocamento de ar. A realização da pipetagem reversa de maneira inapropriada pode afetar a qualidade do laboratório clínico e comprometer, potencialmente, a integridade do resultado.

7.1.1. Utilize ponteiros corretas para o tipo de pipeta a ser utilizado.

7.1.2. Ajuste o volume requerido da amostra (50 µl) segurando a pipeta em uma das mãos e ajustando o volume com a outra.

7.1.3. Segure a pipeta na posição vertical e aperte o botão de aspiração/dispensa até o **segundo estágio**.

7.1.4. Mergulhe a ponteira no tubo contendo o sangue não mais que 2-3 mm da superfície.

7.1.5. Libere o botão de aspiração/dispensa sutilmente para a posição de repouso. Esse procedimento preencherá a ponteira com um volume maior que 50 µl.

7.1.6. Sutilmente remova a pipeta com a ponteira do tubo de sangue, removendo qualquer excesso de sangue da parte externa da ponteira passando-a gentilmente na extremidade do tubo.

Importante: Não utilize gase ou papel para remover o excesso de sangue, eles podem absorver o sangue de dentro da ponteira.

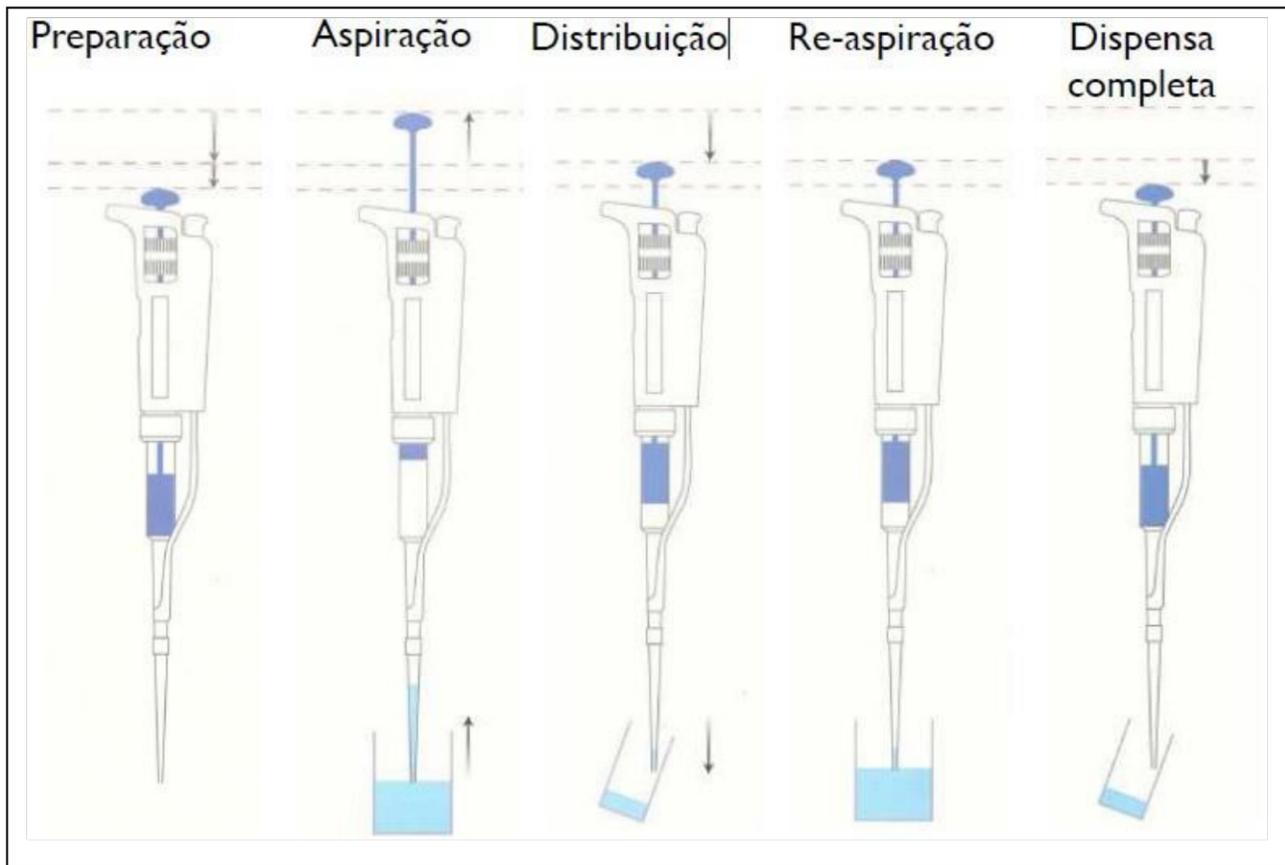
7.1.7. Dispense o sangue em um tubo vazio empurrando gentilmente o botão de aspiração/dispensa até o primeiro estágio. Segure o botão nessa posição por alguns segundos. O sangue que restou na ponteira não deve ser dispensado.

7.1.8. Com o botão na posição de repouso, remova a pipeta com a ponteira do tubo teste e dispense-a em local adequado. Guarde a pipeta em posição vertical.

Importante: Não coloque a pipeta em posição horizontal na bancada de trabalho quando a mesma estiver com ponteira contendo líquido. O líquido pode entrar no sistema mecânico da pipeta e danificá-la.

Veja o resumo do procedimento na figura abaixo:





Repouso

1º Estágio
2º Estágio

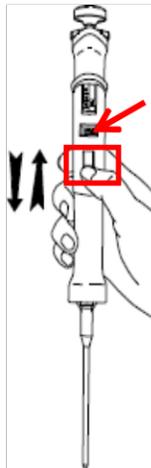


UTILIZAÇÃO DA NOVA PIPETA DE REPETIÇÃO

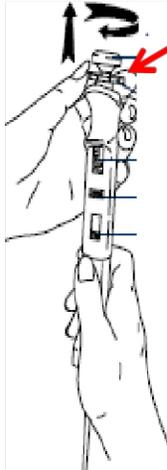
A nova pipeta de repetição é classificada como pipeta de deslocamento positivo onde a pipeta não tem contato direto com a amostra a ser pipetada, pois o contato é via o pistão que existe na pipeta. Para essa pipeta serão utilizadas seringas de capacidade para 12,5 mL com volume de dispensação de 100µL a 1250µL.

Essa pipeta deverá ser utilizada no laboratório para a pipetagem de **450µL** de solução de lise 1:10 nas amostras da rotina. A pipeta fornece 26 pipetagem de 450µL com segurança e a quantidade de seringas utilizadas é de **01 seringa por dia**. Veja as instruções de uso:

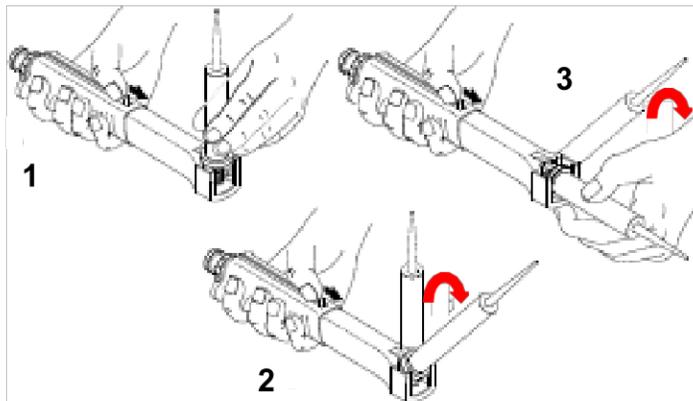
1. Seleccionar a seringa a ser utilizada - **12,5 mL**.



2. Seleccionar o volume: destrave a peça preta empurando para cima e gire até atingir o volume desejado - 450 μ L.



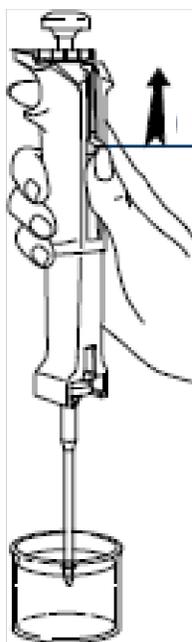
3. Encaixe a seringa na ponta da pipeta como mostrado na figura abaixo:



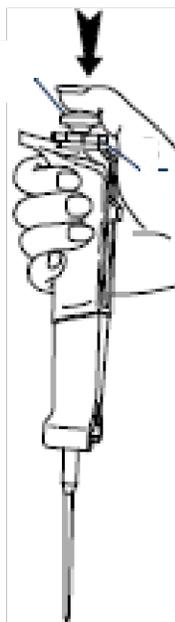
4. Para aspirar prossiga como ilustrado abaixo.



Essa pipeta não possui segundo estágio de dispensa.



Aspirar



Dispensar (até o fim, não possui segundo estágio)



5. A pipeta possui um sinalizador de precisão (“lingueta” vermelha) que quando aparece inteiro indica, que a partir daí, o volume pipetado não é mais confiável. O que deve ser feito é aspirar um novo volume para continuar a pipetagem de maneira confiável.



A pipeta de repetição deve ser limpa somente externamente. Utilizando gaze embebida em álcool isopropílico 70% e em seguida em água destilada.

DICAS DE PIPETAGEM

Uma boa pipetagem é resultado da interação pipetas/operador/ponteiras. A pipeta é um instrumento de precisão confiável e tem sido utilizada há muitos anos. Contudo, como há várias formas de manuseio, diferenças nas técnicas podem alterar o volume aspirado e interferir diretamente nos resultados obtidos. Por isso, seguem algumas dicas para produzir resultados laboratoriais mais precisos:

1. Umedeça a ponteira antes (pré lavagem)

Para melhorar a precisão da sua pipetagem, aspire e despreze completamente uma certa quantidade do líquido, pelo menos uma vez, antes de aspirar definitivamente. Falhas nessa etapa aumentam a evaporação por causa do ar restante na ponta, que pode causar significativa diminuição do volume desejado. Umedecendo a ponteira você reduzirá a evaporação e não haverá problemas com relação a resistência apresentada pelo material da ponteira e o líquido aspirado.

2. Trabalhe em temperatura ambiente

Deixe que os líquidos e equipamentos (pipetas) fiquem em T.A. antes de pipetar. O volume de líquido pipetado varia com a umidade relativa e pressão do líquido – sendo que ambos são termo-dependentes. Trabalhando em uma temperatura constante minimiza variações do volume pipetado.

3. Examine as ponteiras antes de dispensar a amostra

Antes de dispensar, cuidadosamente, remova as gotículas das laterais da parte externa da ponteira encostando a ponteira nas extremidades do tubo. Encoste a ponta na lateral do tubo para dispensar o líquido remanescente. A tensão superficial vai ajudar a retirar esse resto de líquido.

4. Padronize a pipetagem

Para pipetagem convencional (não reversa), aperte o botão até o primeiro estágio, mergulhe a ponteira no líquido e aspire-o, soltando o botão (pré lavagem). Repita o procedimento para pegar o volume final e remova a pipeta do líquido e aperte o botão até o segundo estágio para dispensar todo o conteúdo. A padronização resulta em uma melhor precisão e exatidão.

5. Faça uma pausa depois da aspiração

Depois de aspirar e antes de remover a ponteira do líquido, espere um a dois segundos. Faça uma pausa o mais consistente possível. O líquido continua a fluir para a ponteira por um momento depois que você solta o botão. Ao mesmo tempo, a evaporação na ponteira está ocorrendo. Fazendo uma pausa consistente, você balanceia os dois efeitos e garante uma correta aspiração.



6. Retire a pipeta verticalmente

Na aspiração, mantenha a pipeta na vertical e a retire diretamente do centro do tubo ou frasco. Essa técnica é especialmente importante quando está se pipetando pequenos volumes (menos de 50µL). Segurando a pipeta em um ângulo enquanto é removida do líquido, altera o volume aspirado. Encostar nos lados do tubo também causa perda do volume.

7. Evite ficar segurando a pipeta

Segure a pipeta livremente, e guarde-a enquanto não estiver usando. A calor do corpo transferido durante a pipetagem altera o equilíbrio de temperatura, que leva à variações no volume.

8. Mergulhe a ponteira na profundidade certa

Antes de aspirar, mergulhe a ponteira adequadamente abaixo do menisco. Pipetas de grandes volume (1 a 5 mL) devem ser imersas de 5 a 6 mm, enquanto pipetas de pequenos volumes devem ser imersas de 2 a 3 mm. Menos do que isso há o risco de se aspirar ar.

9. Use a ponteira correta

Use ponteiras de boa qualidade, de preferência da mesma marca da pipeta. Marcas alternativas também são aceitáveis, desde que comprovado sua compatibilidade com o modelo da pipeta. Uma má combinação de ponteira e pipeta pode resultar em imprecisão, inexatidão ou ambos.

10. Use velocidades e pressão constantes

Aperte o botão suavemente, com força e pressão constantes, até o primeiro estágio. Mergulhe a ponteira; então solte o botão a uma taxa constante. É tudo uma questão de ritmo – a repetição gera resultados reprodutíveis.

11. Mantenha a pipeta guardada na vertical. Essa também deve ser a posição de descanso

Essas diferenças na execução podem afetar a exatidão e precisão dos ensaios laboratoriais. Para assegurar a exatidão e consistência, os laboratórios devem adotar procedimentos padrões de pipetagem e assegurar-se de que todos os profissionais, que realizam a rotina, estão treinados e no mesmo nível de proficiência.



Erros mais comuns

1. Trabalhar muito rápido;
2. Remover a ponteira antes da completa aspiração;
3. Arrastar a ponteira nos lados do tubo;
4. Soltar o botão rápido;
5. Não umedecer a nova ponteira;
6. Colocar a pipeta na vertical com ponteira contendo líquido dentro;
7. Virar a pipeta de cabeça para baixo;
8. Tentar ajustar um volume maior que o especificado na pipeta.



GUIA DE LIMPEZA DA PIPETMAN

Material fornecido pela ANALÍTICA (www.analiticaweb.com.br)

As pipetas Gilson são fáceis de limpar e podem ser facilmente desmontadas e reparadas pelo próprio usuário. O uso adequado e a limpeza regular mantêm o desempenho e aumenta a vida útil da pipeta. Após um certo período de utilização, que varia muito de usuário para usuário, a Gilson recomenda que seja adotado o seguinte procedimento:



Não misture as peças de uma pipeta com as de outra.

A. DESMONTAGEM (Vide figura 1)

É necessário que se desmonte a pipeta para fazer a limpeza (deve-se utilizar luvas quando houver risco de contaminação). Antes de desmontar a pipeta, coloque-a no volume máximo de aspiração. Nunca ultrapasse esse volume, pois isso descalibra a pipeta.

1. Retire o ejetor de ponteiros apertando para baixo e puxando-o;
2. Desconecte a porca de conexão separando assim o handle do porta-cone. O handle deve ser bem guardado durante esse procedimento e a limpeza do mesmo será feita somente externamente. A pipeta estando em seu volume máximo de aspiração, evita que nesse momento o pistão salte da pipeta.
3. Remova o conjunto do pistão cuidadosamente e separe o selo (anel de vedação transparente) e o o'ring (anel de vedação preto), mantendo o porta-cone com a parte mais fina para baixo. Frequentemente o selo e o'ring ficam presos dentro do porta-cone. Para retirá-los deve-se recolocar o pistão, pressioná-lo contra o porta-cone, como se fosse fazer uma pipetagem. Retire o pistão que deverá trazer preso a ele, o selo e o'ring. Se isto não ocorrer, o procedimento de limpeza fará com que eles se soltem.





Cuidado para não perder o selo e o ring.

Figura 1: Pipeta desmontada.



B. LIMPEZA

1. Coloque o porta-cone, o conjunto do pistão, o ejetor de ponteiros, o selo e o ring (não colocar o handle) em um recipiente, completando seu volume com solução de detergente neutro (por ex: EXTRAN) de 4% a 8% em água. Na falta do EXTRAN pode ser utilizado shampoo Johnson.
2. Coloque o recipiente no banho maria ($45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) por 20 min.
3. Em seguida, coloque o béquer no banho de ultrassom por 20 min.



Se não tiver ultrassom, deixar na solução por 40 min no banho maria. E se não tiver banho maria, deixar no ultrassom por 35 min ou ainda se não tiver nenhum dos dois, deixe tudo na solução com detergente neutro por 40 min.

4. Descarte a solução de detergente utilizada;
5. Lave cada peça com bastante água corrente;
6. Faça a última lavagem com água destilada e coloque as peças em um recipiente limpo;
7. Seque as peças na estufa a aproximadamente $50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ (não ultrapasse esta temperatura), durante no máximo 2 horas).



Se não tiver estufa, deixe as peças secarem à temperatura ambiente *overnight* (12 horas).

Nunca aqueça o handle.

OBSERVAÇÕES:

- Use solução de detergente com concentração 4% para limpeza de pipetas que apresentem pouca sujeira e concentração de 8% para limpeza de pipetas que apresentem muita sujeira.
- Para as pipetas, que após a lavagem, continuarem apresentando algum tipo de sujeira, limpe com algodão umedecido com álcool isopropílico 70%.



C. MONTAGEM (Vide figura 1)

1. Coloque o selo e o ring no pistão, encaixando em primeiro lugar o selo (transparente);
2. Encaixe o pistão no porta-cone;
3. Com uma das mãos, segure o handle na posição vertical e encaixe o porta-cone;
4. Em seguida coloque e atarraxe a porca da conexão;
5. Coloque o ejetor de ponteiras.
6. A Pipetman está pronta para uso.

Nessa seção foi utilizada a referência 20, referenciada no final desse documento.



CITÔMETRO



Figura 1-1 BD FACSCalibur

Botão liga/desliga

O botão liga desliga é o que está localizado ao lado direito do instrumento e permite que o mesmo seja ligado e desligado.

Painel de fluidos

Painel onde a vazão da amostra e as funções do sistema de fluido são selecionadas. (figura 1-2)



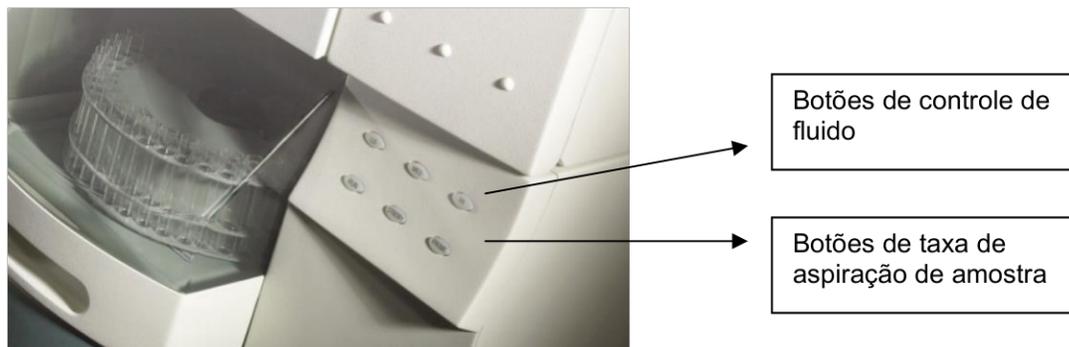


Figura 1-2 BD FACSCalibur- Painéis de fluidos

Botões de controle de fluido

Três botões permitem a escolha dos modos de fluido:

PRIME: remove bolhas da célula de fluxo, usado normalmente durante a resolução de problemas. O fluxo de solução BD FACSTFlow™ primeiramente é interrompido e a pressão revertida retirando toda solução BD FACSTFlow™ da célula de fluxo e encaminhando para o esgoto. Após o esvaziamento o sistema preenche automaticamente a célula de fluxo com solução BD FACSTFlow™ em velocidade controlada para evitar a formação de bolhas. Após o término deste procedimento o equipamento entra automaticamente no modo STANDBY.

RUN: aumenta a potência do laser, inicia o fluxo de solução BD FACSTFlow™ e pressuriza o tubo de amostra para transportar a suspensão de células, através da probe, para a célula de fluxo.

STANDBY: Interrompe o fluxo de solução BD FACSTFlow™ e diminui a potência do laser para prolongar seu tempo de vida.

- **Hard STANDBY:** Quando o botão STANDBY é pressionado o fluxo de solução BD FACSTFlow™ é interrompido e o tubo de amostra deixa de ser pressurizado. Além disso, a corrente do laser é reduzida para estabilizá-lo.

- **AutoSTANDBY:** Se o equipamento está em "RUN" e o braço suporte está deslocado para a direita ou para esquerda, o equipamento entra em auto standby. A luz do botão RUN fica laranja. Aproximadamente 12 segundos após o braço ter sido movido o sistema interrompe o fluxo de solução BD FACSTFlow™. Neste modo, uma bomba de vácuo é acionada para remover a solução BD FACSTFlow™ já que ela pode voltar e gotejar na probe. O sistema retorna ao modo RUN quando o braço é movido novamente para baixo do tubo de amostra. O fluxo de BD FACSTFlow™ é retomado e o laser retorna a potência máxima. O botão RUN muda de laranja para verde.

Botões de vazão de amostra

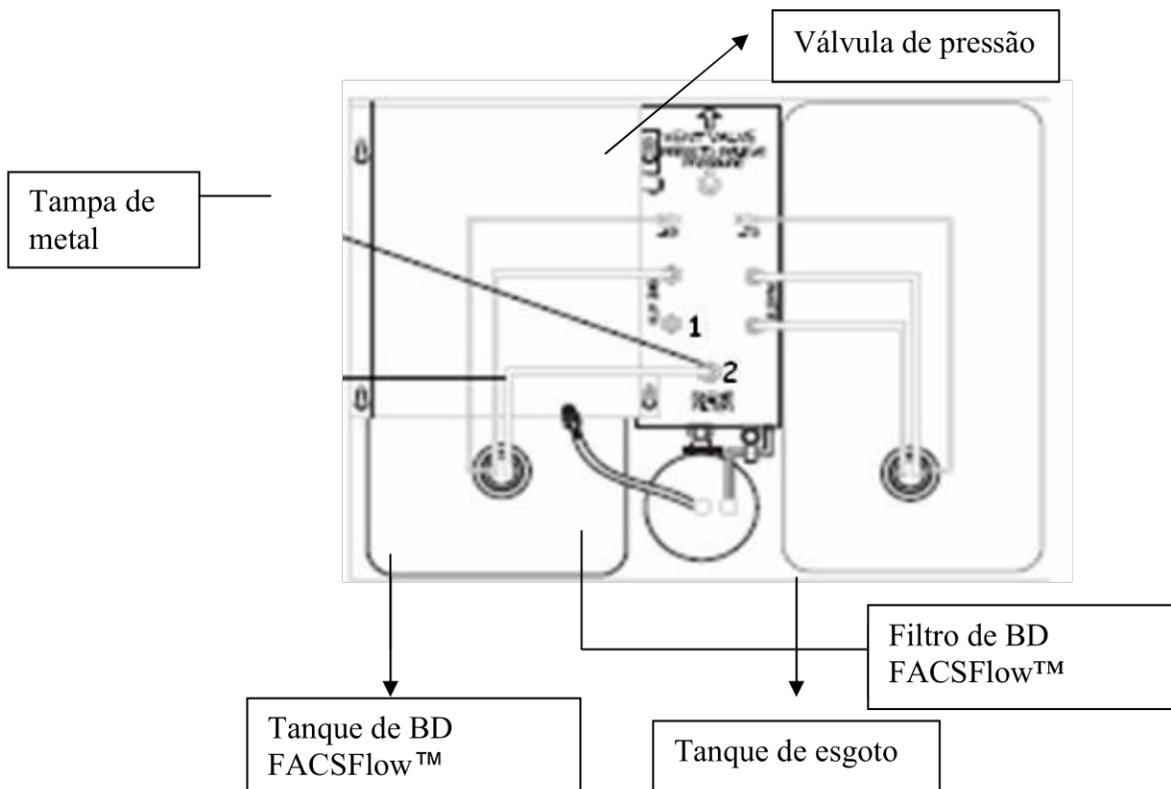
Três botões permitem que a taxa de aspiração da amostra seja selecionada:



- LO: permite a passagem de aproximadamente 12ul/min de amostra na célula de fluxo
- MED: permite a passagem de aproximadamente 35ul/min de amostra na célula de fluxo
- HI: permite a passagem de aproximadamente 60ul/min de amostra na célula de fluxo

GAVETAS DE FLUIDOS

Localiza-se na parte inferior esquerda do equipamento e pode ser aberta permitindo fácil acesso aos tanques de fluidos e filtro de BD FACSTFlow™.



Tanque de fluidos

Este tanque de 4 litros, localizado ao lado esquerdo, comporta solução BD FACSFlow™ para manter o equipamento funcionando por aproximadamente 3 horas. É equipado com um detector de nível de fluidos que indica, via software, quando o tanque está praticamente vazio.

Tampa preta de metal

A tampa evita que o tanque de BD FACSFlow™ infle demasiadamente após a pressurização. Uma aba quadrada do lado direito da tampa preta de metal pressiona uma válvula quando a tampa de metal está na posição travada, permitindo a pressurização do tanque..

Tanque de esgoto

Este tanque de 4 litros, localizado na parte direita da gaveta de fluidos, coleta o esgoto (amostras já lidas) do equipamento.



Cuidado: Caso amostras potencialmente infectantes sejam analisadas no FACSCalibur, tratar este material como resíduo infectante.

Filtro de solução BD FACSFlow™

Este filtro de 0,22µm filtra a solução FACSFlow antes que seja inserida na célula de fluxo. O procedimento de filtragem reduz a quantidade de debris na solução BD FACSFlow™.

Válvula de pressão

Um botão que, quando direcionado para a seta, despressuriza o tanque de solução BD FACSFlow™. Isto permite que o tanque seja removido quando é necessário completar o volume de solução BD FACSFlow™. Quando o botão está direcionado para o lado contrário da seta o tanque é pressurizado, caso a tampa preta de metal esteja posicionada corretamente.

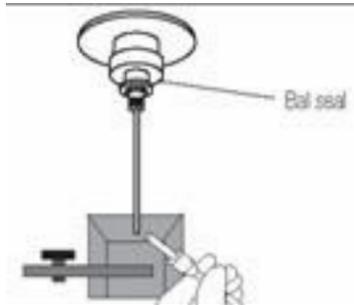
Filtro de ar

Este componente filtra o ar que resfria o laser.



PORTA DE INJEÇÃO DA AMOSTRA OU PROBE

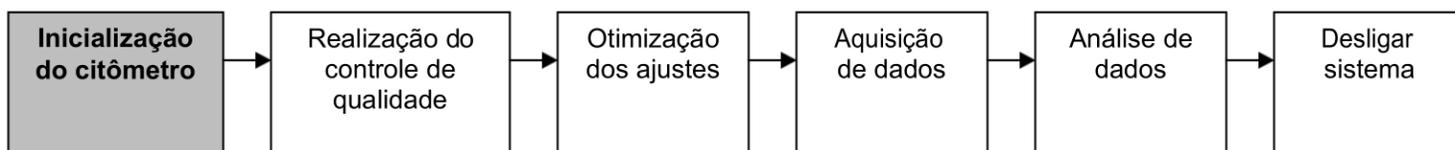
A porta de injeção da amostra (Probe) é a área onde o tubo de amostra é instalado (por onde a amostra é conduzida à célula de fluxo).



Cuidado: Quando estiver posicionando um tubo na probe, posicione o braço para suporte de tubos centralizado abaixo do tubo de amostra o mais rápido possível para evitar que a amostra seja aspirada e descartada no tanque de esgoto.

PROCEDIMENTO DE INICIALIZAÇÃO DO CITÔMETRO

A aquisição de dados no citômetro de fluxo é um processo composto por vários passos. A figura a seguir mostra os principais passos envolvidos. Sempre ligue o citômetro antes de ligar o computador. Isso permite que o computador reconheça que o citômetro está conectado.



Nota: a manutenção diária será apresentada ao final deste módulo.

1. Ligue o citômetro
O botão liga/desliga está localizado na parte inferior direita do equipamento.
2. Ligue o computador
3. Escolha sua identificação de usuário e digite a senha (se aplicável)

PREENCHENDO O TANQUE DE BD FACSFlow™

1. Abra a gaveta de fluidos. Pressione STNDBY. Direcione a válvula de pressão no sentido da seta, retirando, desta forma, a pressão exercida no tanque de BD FACSFlow™.
2. Retire a mangueira de BD FACSFlow™ (branca) e a de ar (azul) do equipamento pressionando o clipe de metal e puxando cada conector de seu encaixe.
3. Desconecte o sensor de fluidos pressionando as laterais enquanto puxa o conector plástico.
4. Empurre a tampa preta de metal e levante a para retirá-la.
5. Retire o tanque de BD FACSFlow™, retire a probe de detecção de fluidos do tanque e preencha o mesmo até $\frac{3}{4}$ da sua capacidade com solução BD FACSFlow™ recomendada.





Cuidado: Evite preencher o tanque de BD FACSTFlow™ até sua capacidade máxima. Quando um tanque cheio é pressurizado o fluido é forçado em direção à mangueira de ar impedindo a pressurização adequada do compartimento. Além disso, como são colocados aproximadamente 400ml de hipoclorito no tanque de esgoto (4L), preencher o tanque de BD FACSTFlow™ em sua capacidade máxima fará com que o tanque de esgoto ultrapasse a capacidade de volume máximo que este tanque comporta.

6. Reposicione o tanque de solução BD FACSTFlow™
7. Recoloque a tampa preta de metal fazendo com que a aba que se encontra ao lado direito da tampa cubra a saliência de borracha.
8. Reposicione os conectores nos locais adequados.
 - Insira a probe de detecção de fluidos no tanque de BD FACSTFlow™.
 - Recoloque a mangueira de ar (azul) no equipamento pressionando o conector até ouvir o clique.
 - Recoloque a mangueira de BD FACSTFlow™ (branca) no equipamento pressionando o conector até ouvir o clique.
 - Verifique se não existem bolhas nas linhas.
9. Cheque o filtro de solução BD FACSTFlow™ para garantir que não hajam bolhas de ar. Se existirem bolhas, gentilmente balance o corpo do filtro para retirá-las. Abra o clipe do filtro permitindo que a solução BD FACSTFlow™ pressurizada remova as bolhas para o tanque de esgoto. Feche o clipe do filtro. Repetir o procedimento se necessário.
10. Cheque as mangueiras de BD FACSTFlow™ do filtro e do tanque para verificar a presença de bolhas. Caso existam bolhas em qualquer destas mangueiras desconectá-las do equipamento e pressionar sua ponta contra um tubo permitindo que a solução BD FACSTFlow™ pressurizada force as bolhas para fora da mangueira.
11. Direcione a válvula de pressão para pressurizar o sistema.
Cheque o tanque de BD FACSTFlow™ para garantir que ele esteja pressurizado adequadamente; ele não deve se mover embaixo da tampa preta de metal.

ESVAZIANDO O TANQUE DE ESGOTO

1. Retire a mangueira de esgoto (laranja) e a de ar (branca) do equipamento pressionando o clipe de metal e puxando cada conector de seu encaixe.





Cuidado: É recomendável que se esvazie o tanque de esgoto sempre que o tanque de BD FACSFlow™ for preenchido. Isto previne que a capacidade máxima de volume que o tanque de esgoto comporta seja ultrapassada. Siga as boas práticas de laboratório: utilize equipamentos de segurança apropriados durante o manuseio de materiais provenientes do tanque de esgoto.

2. Desconecte o sensor de fluídos pressionando as laterais enquanto puxa o conector plástico
3. Retire o tanque de esgoto e a probe de detecção de fluídos de seu interior e esvazie o tanque de acordo com as regulamentações locais, estaduais, e federais de manipulação de material infectante.
4. Preencha o tanque de esgoto com 400mL de hipoclorito puro. Este procedimento permitirá uma diluição final de 1/10 do hipoclorito uma vez que o tanque atingir sua capacidade máxima.
5. Reposicione o tanque de esgoto
6. Reposicione os conectores nos locais adequados
 - Insira a probe de detecção de fluídos no tanque de esgoto
 - Recoloque a mangueira de esgoto (laranja) no equipamento pressionando o conector até ouvir o clique
 - Recoloque a mangueira de ar (branca) no equipamento pressionando o conector até ouvir o clique

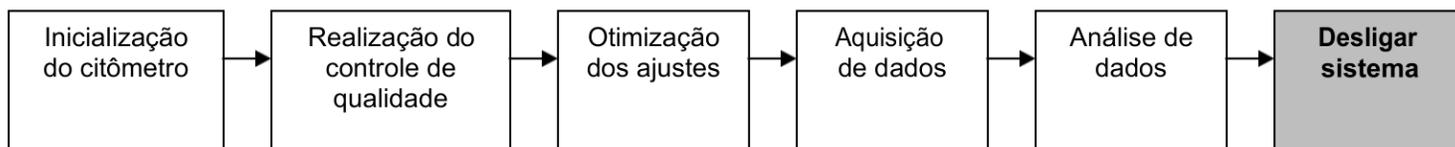


Nota: Permitir que o laser seja aquecido por 5 minutos depois que o equipamento for ligado. antes de introduzir amostras.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas Capítulo 3: Iniciar, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.

PROCEDIMENTO PARA DESLIGAR O CITÔMETRO

A aquisição da dados no citômetro de fluxo é um processo composto por vários passos. A figura a seguir mostra os principais passos envolvidos.



Sempre limpe o instrumento antes de desligá-lo ao final da rotina. A limpeza apropriada irá garantir que o equipamento funcione consistentemente.

Para prevenir que o tubo de injeção de amostra fique obstruído ou para retirar resíduos de corantes é necessário passar hipoclorito na probe ao final do dia seguido por água destilada. Siga este procedimento logo após analisar amostras viscosas ou corantes como Iodeto de propidium, laranja de acridina ou laranja de tiazol.

LIMPEZA APÓS AQUISIÇÃO - COM HIPOCLORITO 0,5 %

1. Selecione o botão de controle de fluídos RUN, instale um tubo contendo 3 mL de hipoclorito na probe com o braço para suporte de tubos posicionado para o lado (direito ou esquerdo). Deixe que o vácuo aspire 2 mL de solução. Usar hipoclorito com concentração de 0,5%.
2. Posicione o braço para suporte de tubos no centro embaixo do tubo de amostra e deixe o hipoclorito correr por 5 minutos.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas Capítulo 7: Desligar, das Instruções de Uso.



LIMPEZA COM ÁGUA DESTILADA

1. Instale um tubo contendo 3mL de água destilada na probe com o braço para suporte de tubos posicionado para o lado (direito ou esquerdo) e deixe que o vácuo aspire 2 mL de água destilada.
2. Posicione o braço para suporte de tubos no centro embaixo do tubo de amostra e deixe correr por 5 minutos em HI.
3. Selecione o botão de controle de fluídos STNDBY.
4. Instale um tubo contendo não mais que 1mL de água destilada na probe.



Cuidado: A solução BD FACSTFlow™ pode retornar para o tubo e fazer com que o volume do tubo ultrapasse sua capacidade máxima se o mesmo tiver mais de 1mL de água destilada. Isto pode afetar a performance do instrumento.

5. Caso não haja mais amostras a serem analisadas, selecione Menu Apple > Shutdown para desligar o computador e então desligar o citômetro.

O tubo de água destilada deve permanecer na probe para evitar que depósitos de sal sejam formados no tubo de injeção de amostra.



MANUTENÇÃO PERIÓDICA

Os seguintes procedimentos de manutenção periódica são necessários para manter a performance do instrumento.

- Limpeza do sistema fluídico (mensal)
- Limpeza do filtro de ar
- Troca da Vedação Bal

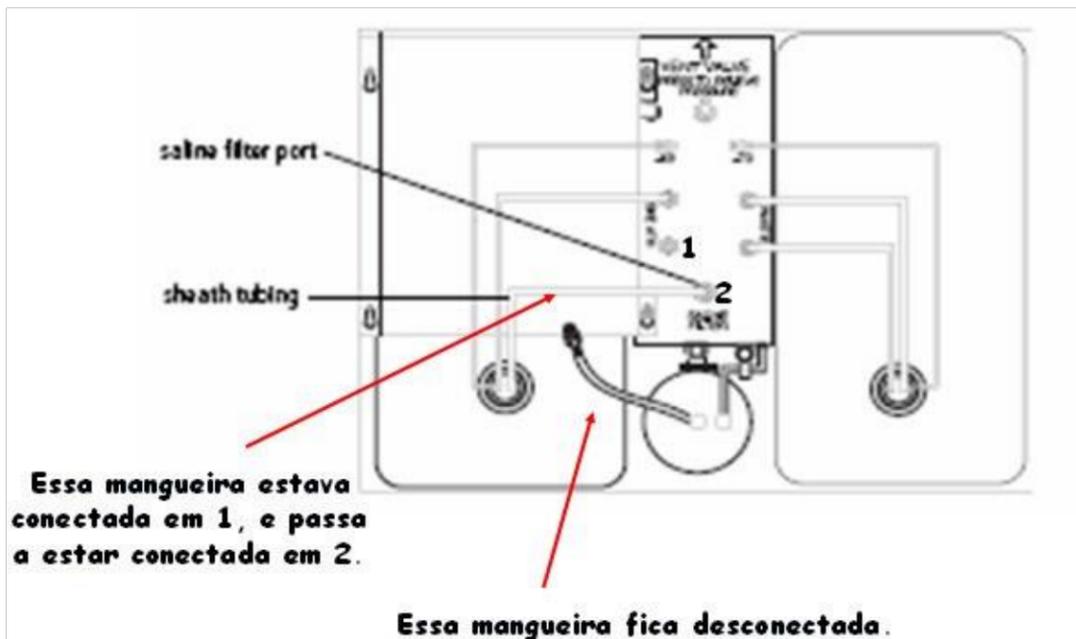
A seção seguinte descreve o procedimento de limpeza do sistema fluídico.

LIMPEZA DO SISTEMA FLUÍDICO

Realizada em todo sistema fluídico deve ser realizada ao menos uma vez ao mês ou mais freqüentemente se houver uma rotina com grande volume de amostras ou corantes como iodeto de propídio, laranja de acridina ou laranja de tiazol forem utilizados.

1. Ligar o citômetro
2. Verifique se a válvula de pressão, localizada entre os reservatórios de fluídos e esgoto, está desligada (sentido contrário da seta).
3. Pressione o clipe de metal, retire a válvula de fluido (branco) e mantenha a válvula de ar (azul) conectada.
4. Desenrosque a tampa do reservatório de fluído e retire o sensor de detecção.
5. Deslize o protetor de metal que fica sobre o reservatório de fluído para a frente.
6. Remova o reservatório de fluído.
7. Instale um reservatório sobressalente (usado somente para esta finalidade) no lugar do reservatório de fluído, contendo 1 a 2 litros de hipoclorito 0,5%.
8. Recoloque o protetor de metal, ajustando-o sobre os pinos e deslizando-o para trás.
9. Pressione o clipe de metal e retire a válvula que está sobre a porta de entrada do filtro de BD FACSCalibur™.
10. Conecte a válvula do fluido (branco) na porta de entrada da válvula do filtro BD FACSCalibur™, que foi retirado. Deixe o conector do filtro BD FACSCalibur™ solto.





11. Ligue a válvula de pressão (sentido da seta).
12. Pressione o botão de velocidade de fluxo em **HI** (Alto) e coloque um tubo contendo 3 mL de hipoclorito 0,5% na injeção de amostra (SIP), com braço fechado.
13. Pressione o botão de controle de fluido **RUN** e deixe a solução ser aspirada por 20 a 30 minutos.
14. Remova o tubo contendo hipoclorito que está na injeção da amostra (SIP).
15. Repita as etapas 6 a 12, substituindo o reservatório de hipoclorito 0,5% pelo reservatório com água destilada (reservado apenas para essa finalidade). O tubo com hipoclorito também deve ser substituído por um tubo contendo 3 mL de água destilada.
16. Finalizadas estas etapas, substitua o reservatório de água destilada pelo reservatório contendo solução BD FACSCalibur™. Instale um tubo contendo 1 mL de água destilada na probe.
17. Selecione o botão STNDBY.

Neste ponto, pode-se desligar o citômetro se não houverem mais amostras. O tubo de água destilada deve permanecer na probe para evitar que depósitos de sal sejam formados no tubo de injeção de amostra.

Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™

Nota: Se o equipamento não for utilizado por uma semana ou mais, realizar uma limpeza do sistema flúídico e mantenha água destilada na probe até que o equipamento seja utilizado novamente.

As informações contidas nessa seção podem ser encontradas Capítulo 7: Desligar, das Instruções de Uso do BD FACSCalibur™.



DICAS PLATAFORMA Mac OS X

A mesa Mac OS X

1. *Menu da Apple*
2. *Ícone Alias*
3. *Dock*
4. *Barra do menu*
5. *Ícone do disco rígido*
6. *Ícone da pasta*



Uso do menu da Apple

About this Mac – exibe informação sobre o computador.

Software Update – identifica novos softwares e permite que você faça o download e instale atualizações no seu computador.

Mac OS X Software – direciona-o para a página inicial do Mac OS X da Apple, onde você pode baixar os softwares de atualizações do Mac OS X.

System Preferences – permite que você faça alterações nas preferências do sistema.

Dock – permite que você faça alterações nas configurações do **Dock**.

Location – permite que você faça alterações nas preferências da rede.

Recent Icons – permite que você abra rapidamente os documentos e aplicativos recentemente usados.

Force Quit – permite que você saia forçado de um aplicativo.

Sleep – permite que você coloque seu computador em modo de espera.

Restart – permite que você re-inicie seu computador.

Shut Down – permite que você desligue seu computador.

Log Out – permite que você desconete o usuário atual.

Organização dos Ícones na sua Mesa

1. Pressione o menu **View**.
2. Faça uma das opções:



- Para adicionar aplicativos ou outros itens ao Dock, arraste o ícone da mesa ou de uma janela **Finder** para o **Dock**. (Posicione os ícones de aplicativos à esquerda e todos os outros ícones à direita do **Divisor**.)

*Nota: Para remover um item do **Dock**, arraste o item para fora do **Dock** para a mesa. Você não pode remover ícones de aplicativos abertos.*

Uso do Exposé

Exposé permite que você tenha acesso instantâneo a qualquer janela da sua mesa.

- Para exibir todas as janelas abertas, pressione **F9**.
- Para exibir todas as janelas abertas d o aplicativo atual, pressione **F10**.
- Para esconder todas as janelas abertas, pressione **F11**.

*Nota: Quando a seta do mouse estiver em descanso (espera) em uma janela após pressionar **F9** ou **F10**, a janela ficará iluminada e o nome será exibido. Para tornar a janela ativa, pressione **F9** ou **F10** novamente ou pressione na janela iluminada.*

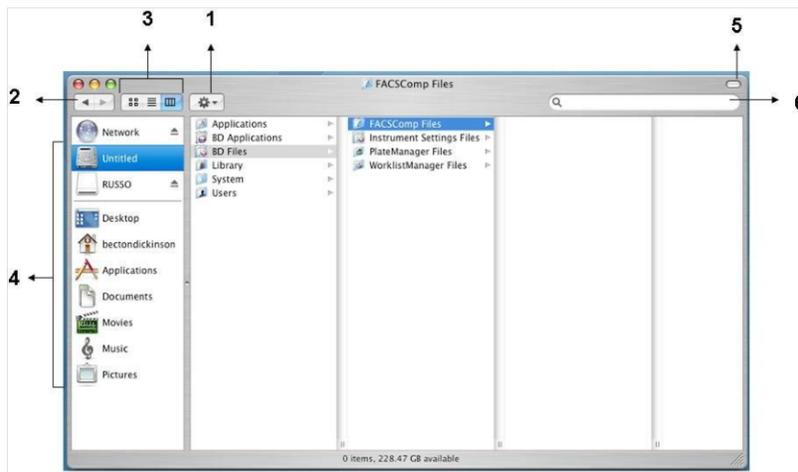
*Nota: Este manual foi escrito usando-se a versão 10.3 do Mac OS. Algumas características podem variar com versões diferentes de OS X. O símbolo **◆ Novo** se refere a itens que são novos na versão 10.3.*

Finder

Uso do Finder

O Finder lhe dá acesso a todos os aplicativos e documentos de seu computador. Para abrir uma janela **Finder**, selecione **New Finder Window** do menu de arquivos ou pressione **Comando + N**. (Como padrão, uma nova janela **Finder** se abre na pasta **Home** do usuário atual.)





1. **Action Menu** – permite que você atue nos itens selecionados na janela Finder.
2. **Forward and Backward Buttons** – permite que você navegue dentro do Finder.
3. **View Buttons** – permite que você altere como os itens são exibidos na janela do Finder. (*Você pode visualizar seus itens como ícones, listas ou em colunas.*)
4. **Sidebar** – exibe os volumes no seu computador incluindo os discos rígidos, volumes de rede, CDs e DVDs.
5. **Toolbar Button** – permite que você esconda e exiba a **Sidebar** e a barra de ferramentas no topo da janela **Finder**.
6. **Search Field** – permite que você procure itens no seu computador.

Ajuste das Preferências do Finder

1. Selecione **Preferências** no menu do **Finder**.
2. Pressione os botões **General**, **Labels**, **Sidebar**, e **Advanced** no topo da janela para ajustar as preferências.
3. Pressione o botão **Fechar** quando tiver terminado.

*Nota: Você também pode pressionar Comando + para acessar as preferências do **Finder**.*



Aplicativos

Começo do Aplicativo

- Para começar um aplicativo na janela do Finder ou da mesa, pressione duas vezes o ícone do aplicativo ou alias.
- Para iniciar um aplicativo do **Dock**, pressione o ícone do aplicativo no **Dock**.
- Para iniciar um aplicativo recentemente usado, selecione **Recent Items** do menu **Apple** e selecione o aplicativo do menu oferecido.

Alternância entre aplicativos abertos

1. Pressione e mantenha pressionado o botão de comando e pressione o botão **Tab** para rolar pelos aplicativos abertos. (Seus aplicativos abertos aparecerão como ícones grandes no centro de sua mesa.)
2. Libere os botões para alternar para o aplicativo selecionado.

Saída do aplicativo

Para sair de um aplicativo ativo, faça uma das seguintes opções:

- Selecione **Quit** no menu de aplicativos.
- **Ctrl + pressione** o ícone do aplicativo no **Dock** e selecione **Quit** do menu pop-up.
- Pressione **Comando + Q**.

Saída Forçada do Aplicativo

1. Selecione **Force Quit** no menu da Apple ou pressione **Comando + Option + Escape**.
2. Selecione o aplicativo na janela **Force Quit Applications**.
3. Pressione o botão **Force Quit**.

*Nota: Você também pode pressionar e manter pressionado **Ctrl + Option** e pressionar o ícone do aplicativo no **Dock**, e selecionar **Force Quit** no menu pop-up.*

Documentos e Pastas

Abrir pastas

- Para abrir uma pasta, pressione duas vezes o ícone da pasta na janela **Finder** ou na mesa.



- Para abrir uma pasta do **Dock**, pressione na pasta para abri-la.

*Nota: Para fechar uma pasta, pressione no botão Fechar na janela do **Finder**.*

Abrir documentos

- Para abrir um documento em uma janela **Finder** ou da mesa, pressione duas vezes sobre o ícone do documento ou alias.
- Para abrir um documento recentemente usado, selecione **Recent Items** do menu **Apple** e selecione o documento do menu oferecido.
- Para abrir um documento com um aplicativo diferente, Ctrl + pressione ícone do documento ou alias, selecione **Open With** do menu pop-up, e selecione um aplicativo do menu oferecido, ou arraste o ícone do documento para o ícone do aplicativo ou alias.

*Nota: Você também pode selecionar o documento na janela **Finder**, pressionar o menu **Action** e selecionar **Open** no menu oferecido.*

Fechar documentos

Para fechar um documento, faça uma das seguintes opções:

- Pressione o botão **Fechar** na janela do documento.
- Selecione **fechar** no menu de arquivos.
- Pressione Comando + W.

Criação de uma nova pasta

1. Abra uma janela **Finder**.
2. Selecione o local onde você quer posicionar a nova pasta.
3. Selecione New Folder no menu de arquivos ou pressione **Comando + Shift + N**.
4. Nomeie a pasta sobre o "untitled folder".
5. Pressione o botão **Return**.



Renomeação de um documento ou pasta

1. Pressione no nome do item para selecioná-lo. *(Uma linha azul irá aparecer ao redor do nome para mostrar que ele foi selecionado.)*
2. Nomeie o documento ou a pasta com novo nome.
3. Pressione a botão **Return**.

Nota: Nomes de arquivos não podem conter alguns caracteres, como por exemplo dois pontos (:), ou barra (/). Você pode não ter permissão para renomear certas pastas.

Mover ou copiar um documento ou pasta

- *Para mover um documento ou pasta, arraste o documento ou pasta para a nova localidade.*
- *Para copiar um documento ou pasta, segure o botão **Option** e arraste o documento ou pasta para a nova localidade.*
- *Para copiar um documento ou pasta usando 'copiar e colar', selecione o item e selecione **Copy** do menu de edição (**Edit**).*

Nota: Para mover ou copiar um item, você poderá precisar abrir uma nova janela Finder.

Adição de um marcador colorido em um item

Você poderá marcar com cores os itens da sua mesa e na janela **Finder** para organizar itens.

1. Ctrl + pressione o item que você quer marcar com cor.
2. Selecione uma cor do menu pop-up.

*Nota: Você também pode selecionar o item que você deseja colorir e selecionar uma cor para marcá-lo a partir do menu de arquivo (**File**).*

Criação de um alias (atalho)

Um alias é um link para itens acessíveis no seu computador, como documentos, pastas e aplicativos. Ícones alias são marcados com uma seta no canto inferior esquerdo.

1. Selecione o item para o qual você deseja criar um alias.
2. Selecione **Make Alias** do menu de arquivos (**File**) ou pressione **Comando + L**.

Nota: Você também pode pressionar e manter pressionado o Comando + Option enquanto você arrasta o ícone do item para a mesa ou para uma outra past



Deletar e recuperar itens deletados

- Para deletar um documento ou pasta, arraste o item para o ícone **Trash** ou Ctrl + pressione no item e selecione **Move to Trash** no menu pop-up. (você não pode colocar itens trancados no **Trash**.)
- Para recuperar um item do **Trash**, pressione duas vezes o ícone **Trash** para abrir o item e arraste o item para fora do **Trash**.

*Nota: Alguns itens o alertarão que serão deletados imediatamente. Pressione o botão **OK** para continuar. Estes itens não são colocados no **Trash** e não podem ser recuperados.*

Esvaziar o Trash (lixeira)

1. Selecione **Empty Trash** do menu **Finder** ou pressione **Comando + Shift + Delete**.
2. Pressione o botão **OK**.

*Nota: Você não pode recuperar itens depois que o **Trash** tiver sido esvaziado.*

Obter informação sobre um item

1. Para obter informação sobre um documento ou pasta, selecione o item na mesa ou em uma janela **Finder**.
2. Selecione **Get Info** do menu de arquivos (**File**) ou pressione **Comando + I**.

*Nota: Você também pode **Ctrl + pressionar** em um item e selecionar **Get Info** no menu pop-up.*

Fontes

Trabalho com fontes

- No Mac OS X, as fontes são armazenadas em várias localidades do seu computador. As fontes são armazenadas na pasta Font da pasta Library do seu disco rígido e na pasta Library da pasta System. (As fontes armazenadas na pasta Library da pasta System são necessárias para a operação do sistema e não devem ser deletadas.)
- Você pode também colocar as fontes na pasta Fonts da pasta Library de sua pasta Home. (Somente você tem acesso às fontes na pasta Fonts da pasta Library ou da pasta Home.)



Pré-visualização das fontes no Font Book

O Font Book é o programa de gerenciamento de fontes padrão construído no Mac OS X. (*Você pode gerenciar suas fontes usando o Font Book ou um aplicativo de gerenciamento de fontes terceirizado.*)

1. Pressione duas vezes o ícone do **Font Book** na janela **Finder**. (*Como padrão, o Font Book está localizado na pasta **Applications** no seu disco rígido.*)
2. Selecione a coleção de fontes na coluna **Collection**.
3. Selecione a família de fontes na coluna **Font**.
4. Pressione o triângulo próximo ao nome da família de fontes e selecione um typeface do menu oferecido.
5. *Opcional:* para pré-visualizar a typeface em diferentes tamanhos, pressione a seta na caixa **Size** do painel pré-visualização e selecione um tamanho.

Habilitação e desabilitação de uma fonte

Você pode usar o Font Book para desabilitar uma fonte de forma que ela não apareça na lista de fontes disponíveis para um aplicativo.

1. Em **Font Book**, selecione a coleção de fontes na coluna **Collection**.
2. Selecione a fonte ou a família de fontes na coluna **Font** que você queira habilitar ou desabilitar.
3. Proceda de uma das maneiras:
 - *Para desabilitar uma fonte*, pressione o botão **Disable** e pressione o botão **Disable** na caixa de diálogo que aparecer.
 - *Para desabilitar um grupo de fontes*, pressione **Option**, pressione em **Disable All**, e pressione o botão **Disable** na caixa de diálogo que aparecer.
 - *Para habilitar uma fonte*, pressione **Enable**.
 - *Para habilitar um grupo de fontes*, pressione **Option** e pressione **Enable All**.

Nota: Você pode não ter permissão para alterar as configurações de fontes.



Instalação de fontes usando o Font Book

1. Pressione duas vezes o arquivo de fontes que você queira instalar. (Como padrão, o **Font Book** se abrirá.)
2. Pressione em **Install Font**. (Isto coloca a fonte na pasta *Fonts* da pasta *Library* de sua pasta *Home*, fazendo com que a fonte seja somente acessível a você.)
3. *Opcional*: Para tornar a fonte acessível a outros usuários, arraste a fonte para a pasta **Computer** na coluna **Collection** do **Font Book**. (Se a pasta **Computer** não estiver aparecendo, pressione no triângulo próximo a **All Fonts**.)

*Nota: Você também pode adicionar fontes manualmente à pasta *Font* de seu disco rígido.*

Remoção de fontes usando o Font Book

Não remova fontes requeridas pelo Mac OS X. Se você usar o modo *Classic*, não remova fontes requeridas para o ambiente *Classic*, incluindo *Charcoal*, *Chicago*, *Geneva*, *Monaco* e *New York*.

1. No **Font Book**, selecione a coleção de fontes na coluna **Collection**.
2. Selecione a fonte que você queira remover na coluna **Font**.
3. Selecione **Remove Font** do menu de arquivos (**File**).
4. Pressione o botão **Remove** da caixa de diálogo que aparecer.

*Nota: você também pode remover manualmente as fontes de sua pasta *Font* de seu disco rígido, desde que tenha permissão.*



Segurança

Esvaziamento seguro do Trash



Itens deletados podem ser recuperados usando-se o software de recuperação de dados mesmo depois que o **Trash** tiver sido esvaziado. Para assegurar que os arquivos não possam ser recuperados, coloque os itens no **Trash** e selecione **Secure Empty Trash** do menu **Finder**. Pressione o botão OK para confirmar que você quer deletar permanentemente os itens no **Trash**.

Bloqueio e desbloqueio de itens

Você pode bloquear seus documentos e pastas para impedir que outros usuários os alterem ou deletem. Você pode não ter acesso ao bloqueio ou desbloqueio de todos os itens.

1. Selecione o documento ou pasta que você queira bloquear ou desbloquear.
2. Selecione **Get Info** do menu de arquivos (**File**) ou pressione **Comando + I**. (Você pode também executar *Ctrl + pressionar no documento ou pasta e selecionar **Get Info** no menu pop-up.*)
3. Faça uma das seguintes opções:
 - Para bloquear o documento ou pasta, cheque a caixa **Locked**.
 - Para desbloquear um documento ou pasta, limpe a caixa **Locked**.
4. Pressione o botão **Close** quando tiver terminado.

*Nota: se a caixa **Locked** estiver marcada, você não terá acesso para bloquear ou desbloquear o item. Para checar os direitos e permissões, pressione o triângulo próximo a **Ownership & Permissions** na janela **Info**.*



Ajuste das preferências de segurança

1. Selecione **System Preferences** no menu **Apple**.
2. Pressione o ícone **Security** na seção **Personal**.
3. Faça uma das seguintes opções:
 - *Para configurar uma senha mestre para o computador*, pressione **Set Master Password**, digite uma senha nas caixas **Master Password** e **Verify**. Digite uma dica na caixa **Hint**, se desejado.
 - *Para solicitar uma senha para despertar o computador*, marque a caixa **Require password to wake this computer from sleep or screen saver**.
 - *Para desabilitar o login automático*, marque a caixa **Disable automatic login**.
 - *Para solicitar uma senha ao fazer alterações nas preferências do sistema de segurança*, marque a caixa **Require password to unlock each secure system preference**.
 - *Para ajustar o computador para log out automático*, marque a caixa **Log out after 60 minutes of inactivity**. Pressione nas setas na caixa de tempo e selecione um tempo para desconectar.
4. Pressione **Close** quando você tiver terminado.

Nota: Você deve ter um nome e senha de administrador para mudar a maioria das configurações de segurança.



Extras

Ejetar itens

Para ejetar discos, CDs, DVDs, volumes de servidor, ou outros itens, faça uma das seguintes opções:

- Selecione o item e pressione **Comando + E**.
- Pressione **F12**.
- Selecione o item e selecione **Eject** do menu de arquivos (**File**).
- Arraste o item para o ícone **Trash** no **Dock**.
- Pressione o botão **Eject** próximo ao ícone do item no **Finder Sidebar**.



Captura da tela

- *Para capturar a tela inteira*, pressione **Comando + Shift + 3**.
- *Para capturar uma seção da tela*, pressione **Comando + Shift + 4** e pressione e arraste o apontador do mouse para selecionar a seção.
- *Para capturar a janela ativa*, pressione **Comando + Shift + 4**. Quando a seta do mouse se transformar em um alvo (#), pressione o **Spacebar**. O apontador do mouse se transformará em uma câmera. Pressione o apontador do mouse para capturar a janela.

Nota: Você não pode capturar o apontador do mouse usando este utilitário de captura. As imagens são salvas no formato .pdf.



Uso do utilitário Grab

1. Abra o utilitário **Grab**. (Como padrão, o Grab está localizado na pasta **Utilities** da pasta **Applications** do seu disco rígido.)
2. Pressione no menu **Capture** e faça uma das seguintes opções:
 - Para capturar uma seleção, selecione **Selection** do menu oferecido e arraste o apontador do mouse até a seleção.
 - Para capturar uma janela, selecione **Window** do menu oferecido, pressione o botão **Close Window**, e pressione na janela.
 - Para capturar a tela inteira, selecione **Screen** do menu oferecido e pressione fora da janela **Screen Grab**.
 - Para cronometrar a captura, selecione **Timed Screen** no menu oferecido e pressione o botão **Start Timer**. (Como padrão, o Grab irá capturar a tela dez segundos após você pressionar o botão **Start Timer**).

*Nota: Para guardar uma captura, selecione **Save** do menu **File** e digite o nome do arquivo na caixa **Save As**. Selecione um local e pressione o botão **Save**. O Grab salva arquivos no formato **.tif**.*

Desconectar

1. Selecione **Log Out** “user name” do menu **Apple** ou pressione **Comando + Shift + Q**.
2. Pressione o botão **Log Out** na caixa de diálogo que aparece.

*Nota: Para desconectar imediatamente, pressione **Comando + Shift + Option + Q**.*

Reiniciar o computador

1. Feche documentos e aplicativos abertos.
2. Selecione **Restart** do menu **Apple**.
3. Pressione o botão **Restart**.



Fechar o computador

1. Feche documentos e aplicativos abertos.
2. Selecione **Shut Down** do menu **Apple**.
3. Pressione o botão **Shut Down**.

*Nota: Se outros usuários estiverem conectados no computador, você deve digitar o nome e senha do administrador nas caixas **Name** e **Password** e pressionar o botão **Shut Down** ou desconectar cada usuário individualmente.*

Impressão

Uso do utilitário de configuração da impressora

1. Abra o **Printer Setup Utility**. (Como padrão, o **Printer Setup Utility** está localizado na pasta **Utilities** do **Applications** no seu disco rígido.)
2. Faça qualquer uma das opções:
 - Para configurar as preferências no **Printer Setup Utility**, selecione **Preferences** no menu **Printer Setup Utility** e selecione as opções.
 - Para adicionar uma impressora, selecione **Add Printer** no menu **Printers**, ou pressione o botão **Add**. Localize e selecione a impressora que você queira adicionar e pressione o botão **Add**.
 - Para configurar uma impressora como a impressora padrão, selecione a impressora da lista de impressoras e selecione **Make Default** no menu **Printers**, pressione o botão **Make Default**, ou pressione o **Comando +D**.
 - Para deletar uma impressora, selecione a impressora da lista de impressoras e selecione **Delete Selected Printers** do menu **Printers**, ou pressione o botão **Delete**.
3. Pressione **Close** quando tiver terminado.



Ajuda

Uso do Help Viewer

- Para abrir o Mac Help, selecione **Mac Help** do menu **Help** ou pressione **Comando + ?**.
- Para buscar no Mac Help, pressione o atalho **Browse Mac OS Help**. Selecione um assunto no painel à esquerda, selecione um subassunto, e pressione um assunto para abrir o texto de ajuda.
- Para navegar no Help Viewer, pressione os botões **Back** e **Forward**, ou pressione o botão **Home** para retornar para o Mac Help Home.
- Para imprimir um assunto do Help, abra o assunto e selecione **Print** no menu **File**. (Se houver uma coluna de conteúdos ao lado, pressione no texto do assunto selecionado e selecione **Print** do menu **File**.)

Uso da busca no Help

1. *Opcional:* Para visualizar toda a ajuda disponível, pressione no ícone da lupa na caixa **Ask a Question** e selecione **Search All Help** do menu oferecido.
2. Digite uma palavra ou frase na caixa **Ask a Question** e pressione **Return**.
3. Faça uma das seguintes opções:
 - Para visualizar o resumo de um assunto, pressione em um assunto da lista. (O resumo é exibido na parte de baixo da janela **Help Viewer**.)
 - Para abrir o assunto, pressione duas vezes um assunto da lista.

Nota: Para começar uma nova busca em uma janela separada, selecione **New** do menu **File** ou **Comando+ N**.



Shortcuts

Shortcuts comuns do Mac OS X

Fechar janela	+ W	File / Close Window
Fechar todas as janelas	+ Option + W	-
Conectar com o servidor de rede	+ Shift + K	Go / Network
Conectar com o servidor	+ K	Go / Connect to server
Copiar	+ C	Edit / Copy
Criar Alias	+ L	File / Make alias
Cortar	+ X	Edit / Cut
Duplicar	+ D	File / Duplicate
Ejetar	+ E	File / Eject
Encontrar	+ F	File / Find
Forçar a saída	+ Option + Esc	Apple / Force Quit
Obter informação	+ I	File / Get info
Esconder Finder	+ H	Finder / Hide Finder
Esconder outros	+ Option + H	Finder / Hide Others
Desconectar	+ Shift + Q	Apple / Log out "user name"
Ajuda do Mac	+ ?	Help / Mac Help
Minimizar a janela	+ M	Window / Minimize Window
Mover para o Trash	+ Delete	File / Move to Trash
Nova janela Finder	+ N	File / New Finder Window
Nova pasta	+ Shift + N	File / New Folder
Abrir	+ O	File / Open
Colar	+ V	Edit / Paste
Salvar	+ S	File / Save
Mostrar / Ocultar Dock	+ Option + D	Apple / Dock / Turn Hiding On/Off
Mostrar original	+ R	File / Show Original



Selecionar tudo	+ A	Edit / Seçect All
Trocar de aplicativo	+ Tab	-
Desfazer	+ Z	Edit / Undo
Vizualizar como colunas	+ 3	View / View as Columns
Visualizar como ícones	+ 1	View / View as Icons
Visualizar como listas	+ 2	View / View as Lists
Sair do aplicativo	+ 0	“Application” Menu / Quit “Application”



Símbolos para caracteres Especiais

Comando	
Controle	^
Deletar	□
Seta para Baixo	†
Fim	™
Enter	
Escapar (esc)	Š
Deletar para frente	⊠
Seta para esquerda	*
Opção	~
Página para baixo	‡
Página para cima	□
Retorno	↵
Seta para direita	*
Shift	6
Topo (Home)	™
Seta para cima	T



REFERÊNCIAS

1. Murphy, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.
2. Abbas, A. K et al. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8ª ed. 2015.
3. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Communications in Clinical Cytometry*. 1996; 26: 16-21.
4. Lederman MM, Penn-Nicholson BA, Cho M, Mosier MD. Biology of CCR5 and its role in HIV infection and treatment. *JAMA* 2006; 296 (7): 815-827.
5. Mattapallil JJ, Hill B, Douek DC, Roederer M. Systemic vaccination prevents the total destruction of mucosal CD4 T cells during acute SIV challenge. *Journal of Medical Primatology*. 2006; 35:217-224
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Profilaxia Pós-Exposição (PEP) de Risco à Infecção pelo HIV, IST e Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: < <http://www.aids.gov.br/pt-br/tags/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas/>> Acesso em : novembro de 2021.
7. Costa, RN. *Introdução à Citometria de Fluxo: Um manual básico para iniciantes*. 1. ed. Curitiba: Independently published, 2020.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/cq-facscalibur-controle-de-qualidade>> Acesso em : novembro de 2021.
9. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS; CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. *Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep*. 2003 Jan 31;52(RR-2):1-13
10. Nikolac, Nora. "Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management." *Biochemia medica* vol. 24,1 57-67. 15 Feb. 2014, doi:10.11613/BM.2014.008
11. Sarmiento-Monroy JC, Mantilla RD, Rojas-Villarraga A, et al. Sjögren's syndrome. In: Anaya JM, Shoenfeld Y, Rojas-Villarraga A, et al., editors. *Autoimmunity: From Bench to Bedside* [Internet]. Bogota (Colombia): El Rosario University Press; 2013 Jul 18. Capítulo 28.
12. Kevin L. Bowen, Erroneous Leukocyte Counts and Cold Agglutinins, *Laboratory Medicine*, Volume 28, Issue 4, 1 April 1997, Pages 247–250, <https://doi.org/10.1093/labmed/28.4.247>
13. Analítica. Técnicas de pipetagem e outros materiais de apoio: <https://www.analiticaweb.com.br/literaturas_download.php?tit=pipetas&an=d2c6f32fa176e001d4f0c17418efd586&Bgrupo=17&Brepr=10&Bcat=00+T%E9cnicas+de+pipetagem+e+outros+materiais+de+apoio>. Acesso em : novembro de 2021.



Quantificação de linfócitos T CD4/CD8

BD FACSCalibur™

14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/gestores/sistemas-de-informacao>> Acesso em : novembro de 2021.

Conforme requerido, o(s) produto(s) BD citado(s) encontram-se devidamente regularizado(s) junto à ANVISA. Para mais informações, contacte à BD em SAC: 0800 055 5654 ou cs_brasil@bd.com.” ou, alternativamente, o número de regularização na ANVISA. □

Código para rastreo no sistema Veeva Vault - BD-45813





ANEXOS





Manual de Configuração de Exportação/Importação de arquivos (BD Multiset™/SISCEL)



ÍNDICE

Configuração do BD Multiset™ para exportação de arquivo para o SISCEL	3
Transporte do arquivo do MACINTOSH para o PC	9
Importação de resultado - CD4	13
Localizando o arquivo exportado pelo BD Multiset™	14
Identificando amostras no SISCEL.....	15
Selecionando exames para importação.....	16
Importando resultado de exames do BD Multiset™ para o SISCEL	17
Problemas encontrados	17



Configuração do BD Multiset™ para exportação de arquivo para o SISCEL

Inicialmente, abrir o BD Multiset™, com duplo clique sobre o ícone:



Na tela inicial, clicar em “ACCEPT”, conforme figura 1.

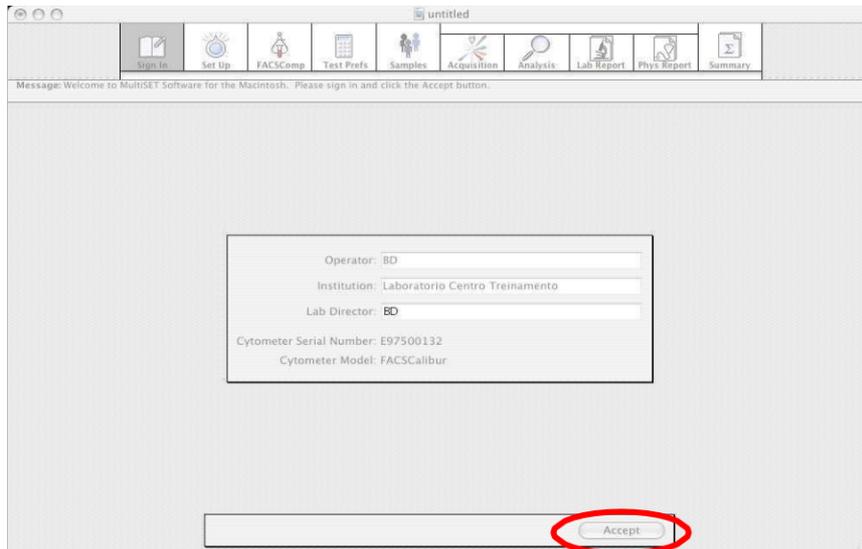


Figura 1 – Tela inicial do BD Multiset™

Após clicar na opção descrita na figura 1, o programa apresentará a tela da figura 2.

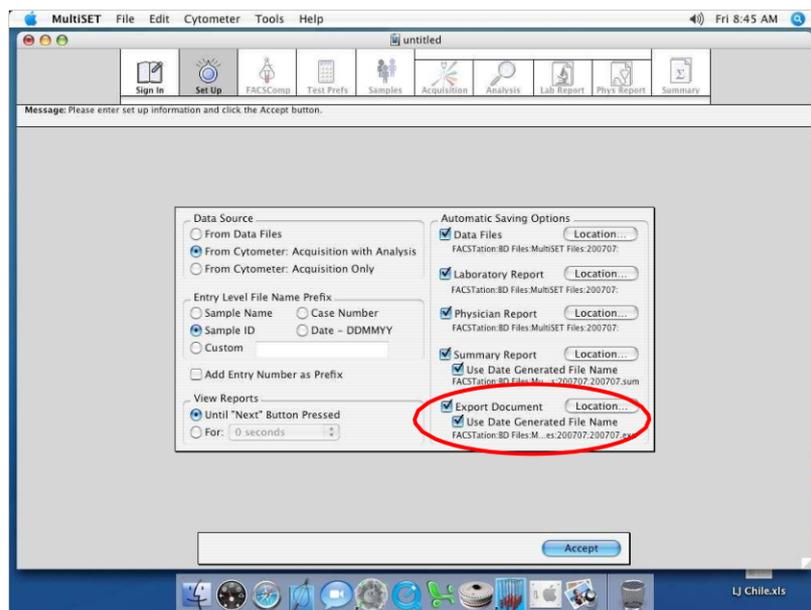


Figura 2 – Selecionando a opção de exportar arquivo



Note que as opções “EXPORT DOCUMENT > USE DATE GENERATED FILE NAME” devem estar selecionadas. Vá então até o menu superior e abra a opção “BD MULTISET™ > PREFERENCES”, conforme mostrado na figura 3.

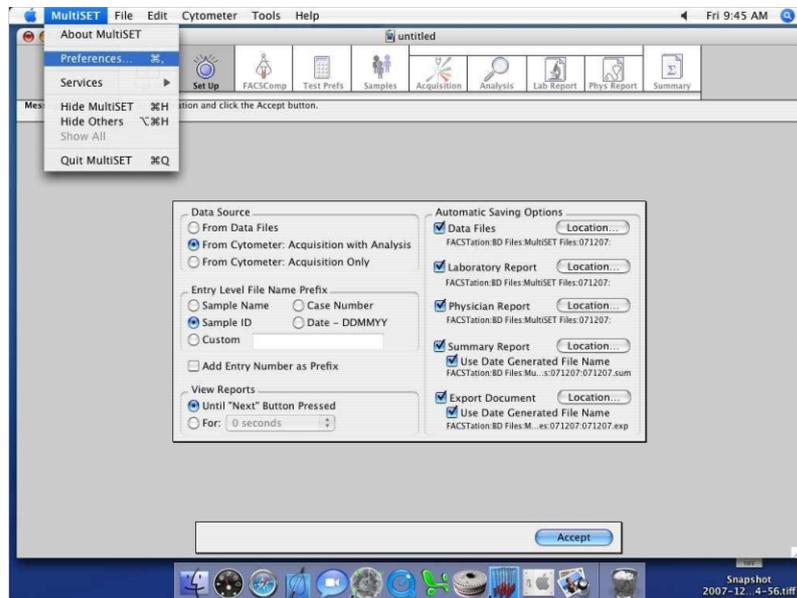


Figura 3 – Abrindo a opção PREFERENCES

Selecionada essa opção, o próximo passo é procurar pela opção “EXPORT” (primeira opção) no menu do lado esquerdo da tela, conforme figura 4.

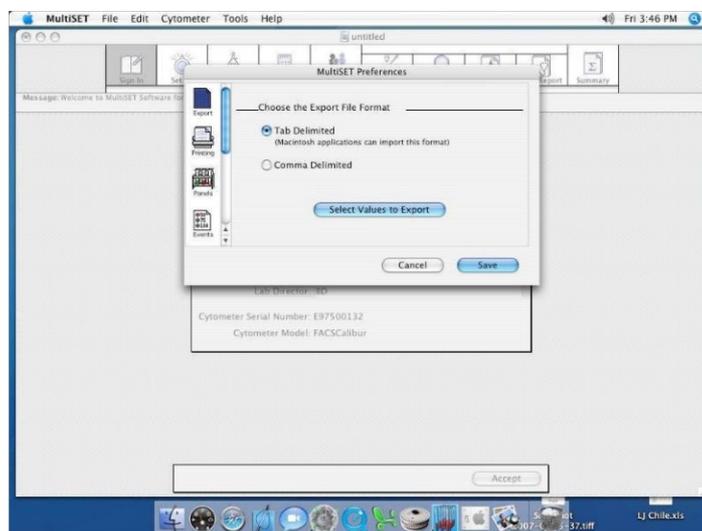


Figura 4 – Configuração de exportação do BD Multiset™

Na tela mostrada na figura 4, é necessário selecionar a opção “TAB DELIMITED”, feito isso, é necessário clicar no botão “SELECT VALUES TO EXPORT”. A próxima tela é composta por duas colunas, conforme mostrado na figura 5.



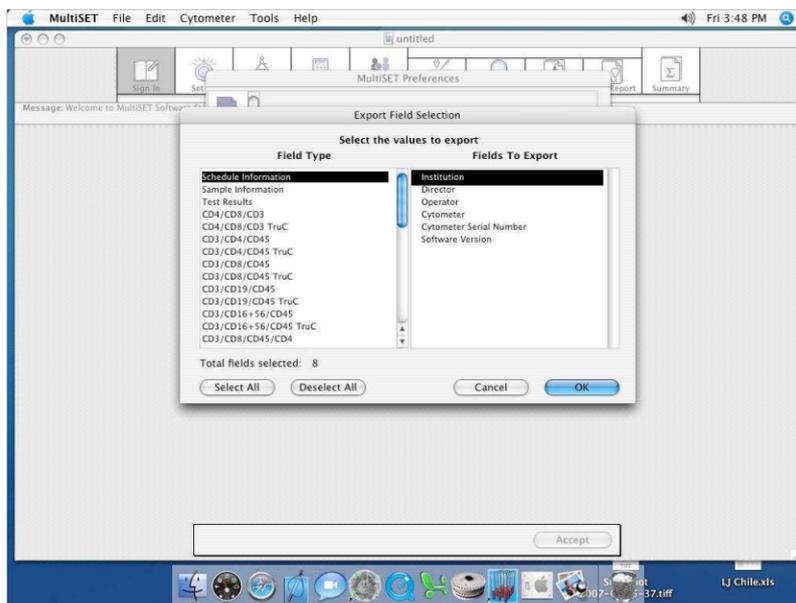


Figura 5 – Seleção de parâmetros a serem exportados.

A coluna da esquerda é composta por diversos grupos diferentes, nas três primeiras linhas aparecem os dados gerais do programa. Já na coluna da direita aparece a descrição de cada um dos campos a serem exportados. Como configuração padrão, o BD Multiset™ possui mais de 200 campos a serem exportados. O primeiro passo então é clicar no primeiro item da esquerda “SCHEDULE INFORMATION”, e em seguida, clicar no botão “DESELECT ALL”, conforme destacado na figura 6.

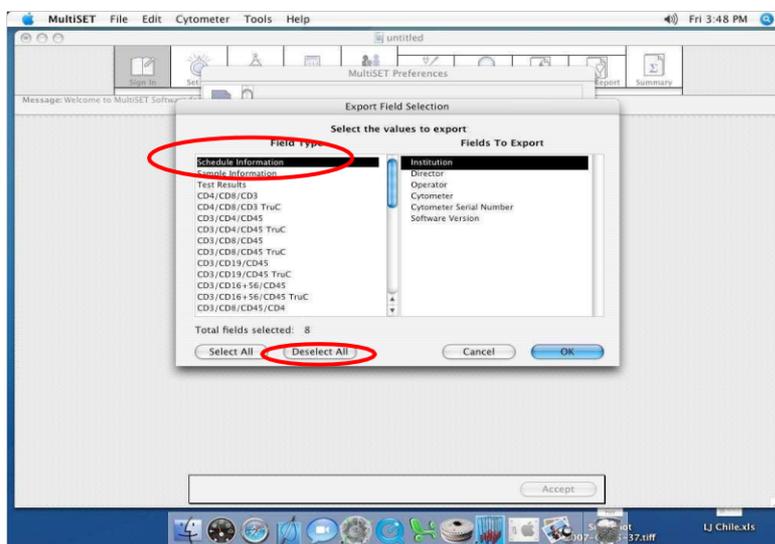


Figura 6 – Procedimento para desmarcar itens

Esse mesmo procedimento deve ser repetido em todos os itens do lado esquerdo, até que apareça o valor 0 (zero) para o campo “TOTAL FIELDS SELECTED”. Esse campo é destacado na figura 7.



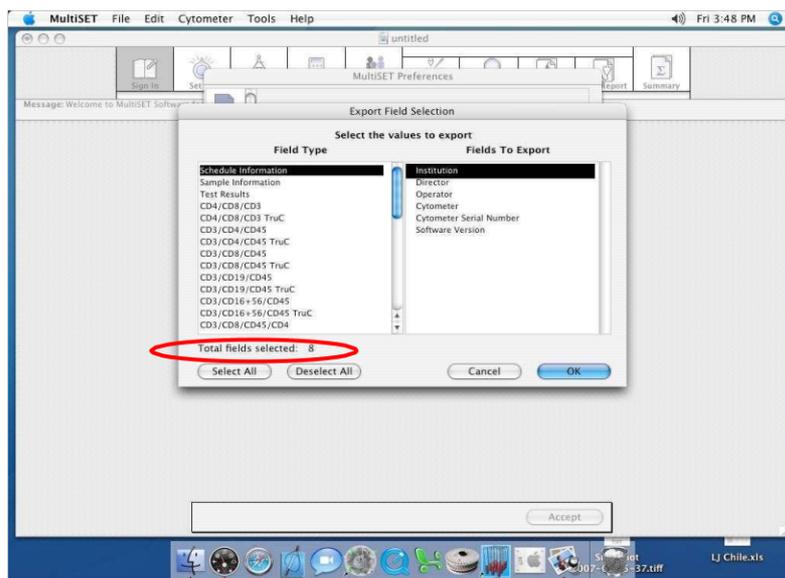


Figura 7 – Localização do campo “TOTAL FIELDS SELECTED”

Assim que não houver mais nenhum campo selecionado, é necessário então selecionar quais os campos a serem exportados. Na coluna da esquerda “FIELD TYPE”, selecione a opção “SAMPLE INFORMATION”. Marque então, na coluna da direita “FIELDS TO EXPORT” somente duas opções: “SAMPLE ID” e “DATE ANALYZED”, conforme mostrado na figura 8.

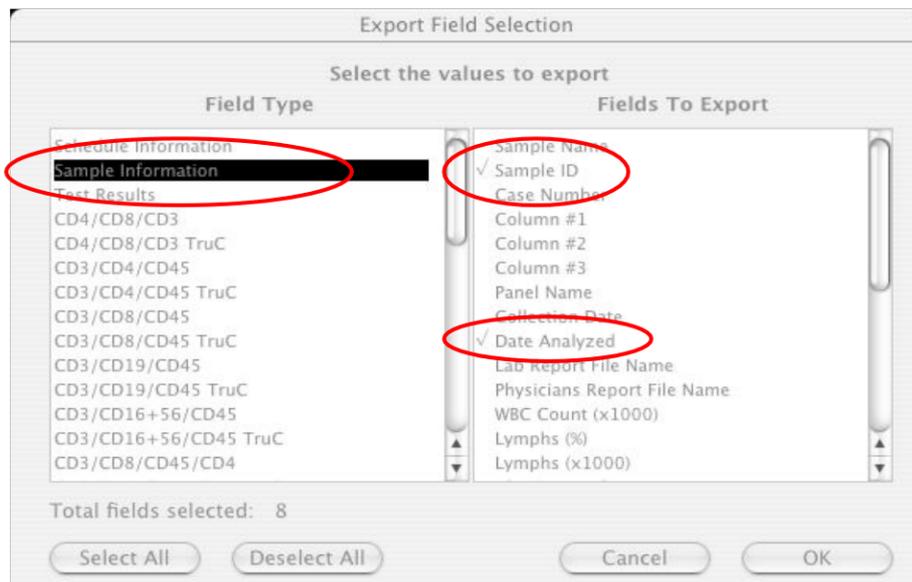


Figura 8 – Campos a serem selecionados na opção “SAMPLE INFORMATION”

O próximo passo é procurar pela décima quinta linha da coluna esquerda “CD3/CD8/CD45/CD4 TruC”. Nessa opção, mais oito campos serão selecionados: “COLLECTION TIME”, “CD3+ %Lymph”, “CD3+ Abs Cnt”, “CD3+ CD8+ %Lymph”, “CD3+ CD8+ Abs Cnt”, “CD3+ CD4+ %Lymph”, conforme figura 9a. Corra a barra lateral de rolagem para baixo, até o fim da lista, selecione então os seguintes campos “CD3+ CD4+ Abs Cnt” e, finalmente, “CD45+ Abs Cnt”, conforme figura 9b. Note que aparece o valor 10 (dez) no campo “TOTAL FIELDS SELECTED”.



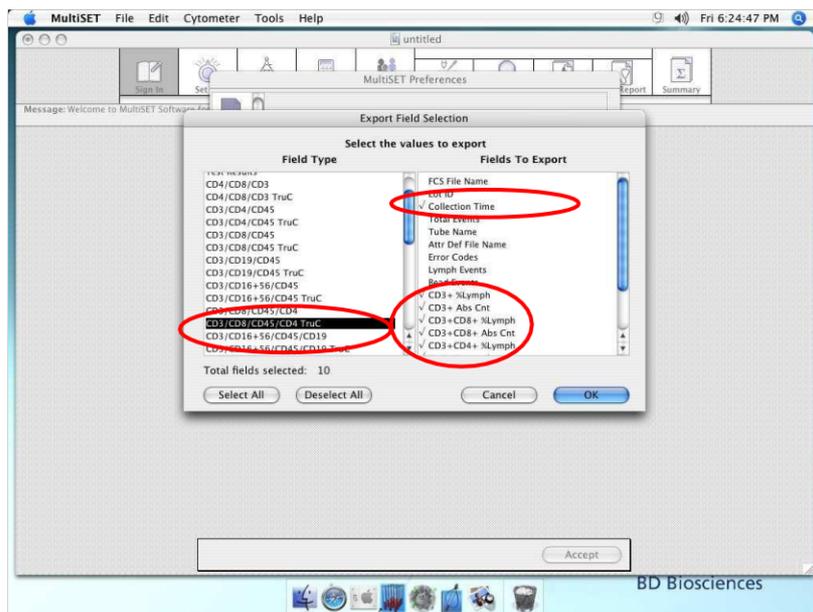


Figura 9a – Selecionando campos a serem exportados

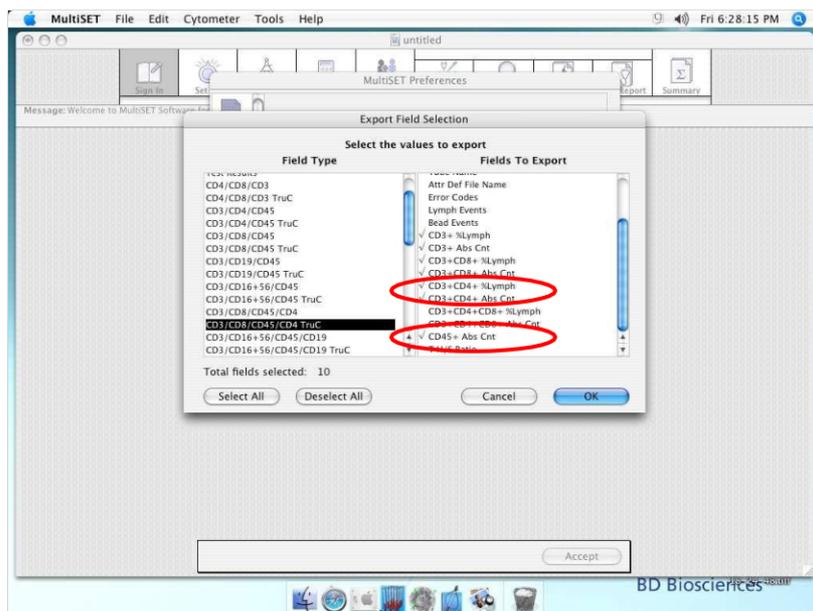


Figura 9b – Selecionando campos a serem exportados

Assim, a seleção dos campos a serem exportados está terminada. Clique em “OK” para fechar essa janela, o programa retornará então para a tela mostrada da figura 4. Clique agora em “SAVE”, dessa forma, a configuração do BD Multiset™ está terminada.

No momento de passar a rotina, é importante lembrar que o campo “SAMPLE ID” da lista de pacientes do BD Multiset™ deve ser preenchido com o mesmo código de “IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRA” utilizado para a inserção dos dados do paciente no SISCEL.



Message: Please enter the Sample information and then click the Run Tests button. Sample ID and Panel Name are required for each entry.

	Sample Name	Sample ID	Case Number	Panel Name	WBC Count (x1000)	Lymphs (%)
1				Rotina 1	0.0	0.0
2				Rotina 1	0.0	0.0
3				Rotina 1	0.0	0.0
4				Rotina 1	0.0	0.0
5				Rotina 1	0.0	0.0
6				Rotina 1	0.0	0.0
7				Rotina 1	0.0	0.0
8				Rotina 1	0.0	0.0
9				Rotina 1	0.0	0.0
10				Rotina 1	0.0	0.0
11				Rotina 1	0.0	0.0
12				Rotina 1	0.0	0.0
13				Rotina 1	0.0	0.0
14				Rotina 1	0.0	0.0
15				Rotina 1	0.0	0.0
16				Rotina 1	0.0	0.0
17				Rotina 1	0.0	0.0
18				Rotina 1	0.0	0.0
19				Rotina 1	0.0	0.0
20				Rotina 1	0.0	0.0
21				Rotina 1	0.0	0.0
22				Rotina 1	0.0	0.0
23				Rotina 1	0.0	0.0
24				Rotina 1	0.0	0.0

Buttons: Stop, Add Samples..., Run Tests

Figura 10 – Lista de pacientes e destaque do campo “SAMPLE ID”



Transporte do arquivo do MACINTOSH para o PC

Clique na região inferior da tela, em qualquer das áreas mostradas na figura 11.

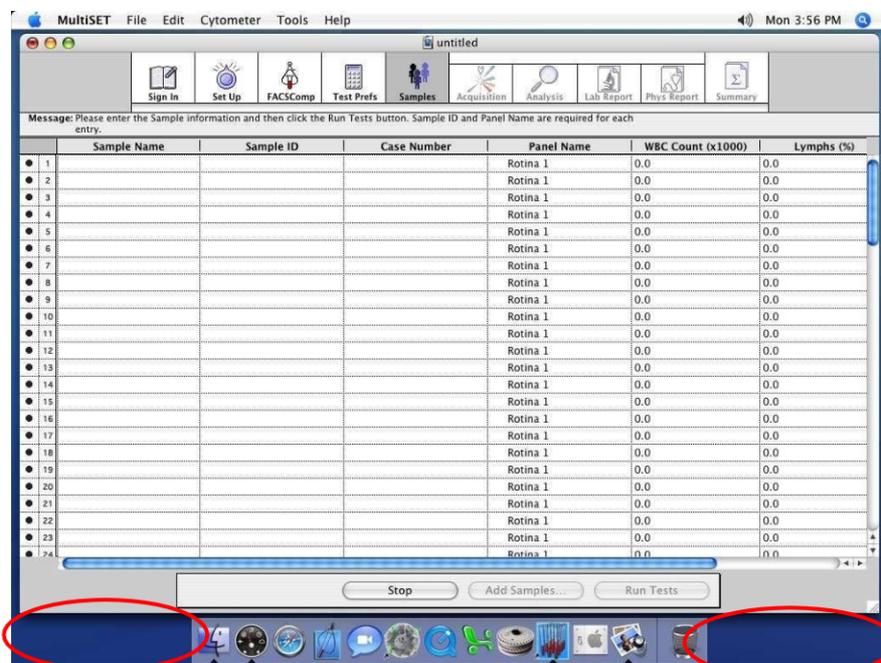


Figura 11 – Retornando à área de trabalho.

Dê um clique duplo então no ícone FACStation, conforme destacado na figura 12.



Figura 12 – Ícone FACStation



O próximo passo é seguir o caminho: FACSTATION > BD FILES > BD MULTISSET™ FILES > “DIA DA ROTINA”, conforme mostrado na figura 13. Dentro da pasta do dia em que ocorreu a rotina, procure pelo arquivo com a extensão .EXP. Por exemplo, se a rotina foi passada no dia 16 de abril de 2007, procure pelo caminho: FACSTATION > BD FILES > BD MULTISSET™ FILES > 160407 > 160407.exp.

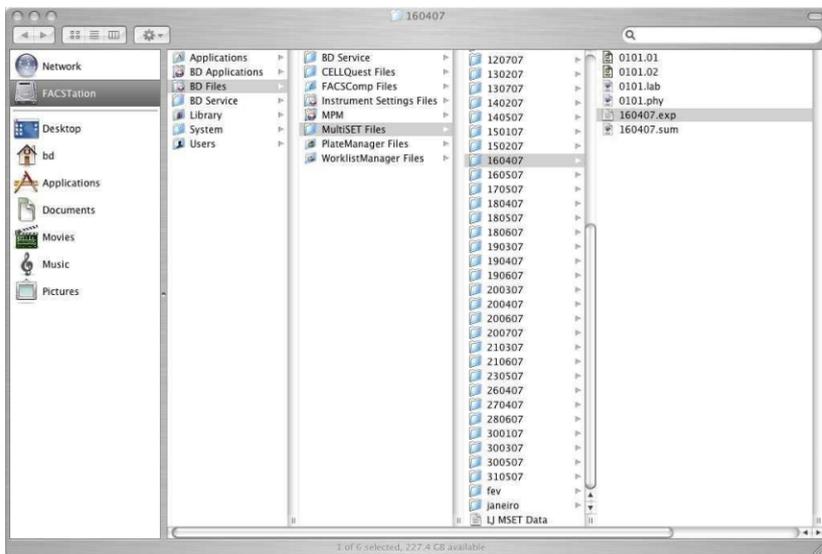


Figura 13 – Buscando o arquivo de exportação no MACINTOSH

Selecione então esse arquivo e vá para o menu EDIT > COPY 161207.exp, conforme a figura 14.

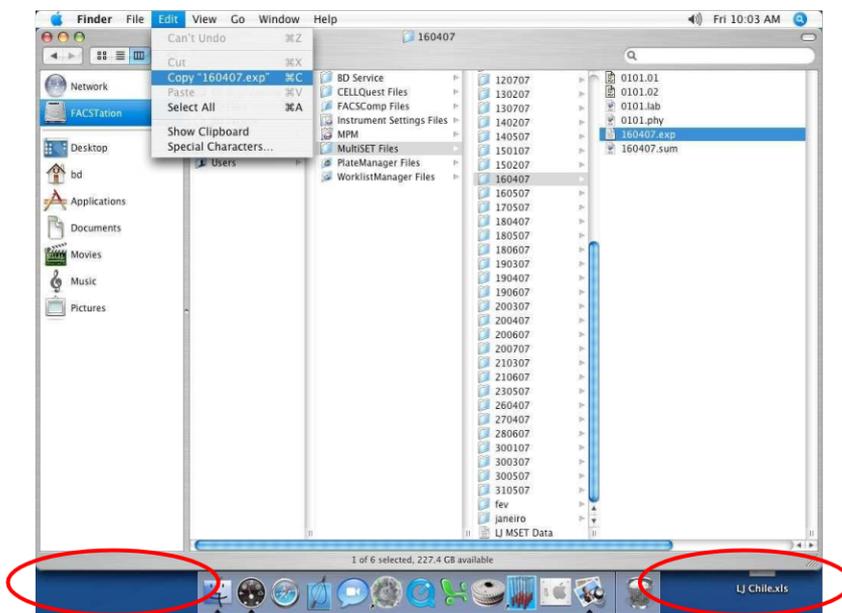


Figura 14 – Copiando o arquivo de exportação, e retornando a área de trabalho



Clique na área de trabalho (qualquer região na parte inferior da tela, conforme destacado na figura 14). De posse de um PEN DRIVE, conecte o mesmo em qualquer porta USB disponível.

Um novo ícone aparecerá na área de trabalho do MACINTOSH .

Com um clique duplo, abra o PEN DRIVE. Uma vez aberto, clique em EDIT > PASTE ITEM (figura 15.a), o arquivo 160407.exp deve aparecer, conforme mostrado na figura 15.b.



Figura 15.a



Figura 15.b

Figuras 15.a e 15.b – Colando o arquivo e verificando se o mesmo foi armazenado

Volte à área de trabalho e clique novamente no ícone do PEN DRIVE.
Com o mesmo selecionado, no menu superior, selecione FILE > EJECT.



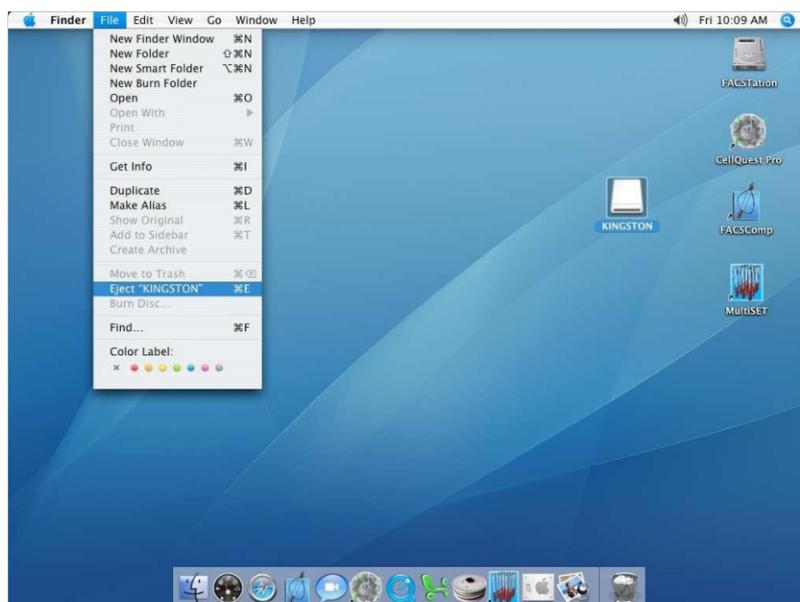


Figura 16 – Ejetando o PEN DRIVE do MACINTOSH

Agora o PEN DRIVE já pode ser retirado do computador. Vá até o PC e conecte o PEN DRIVE, o mesmo deve ser reconhecido automaticamente pelo WINDOWS.

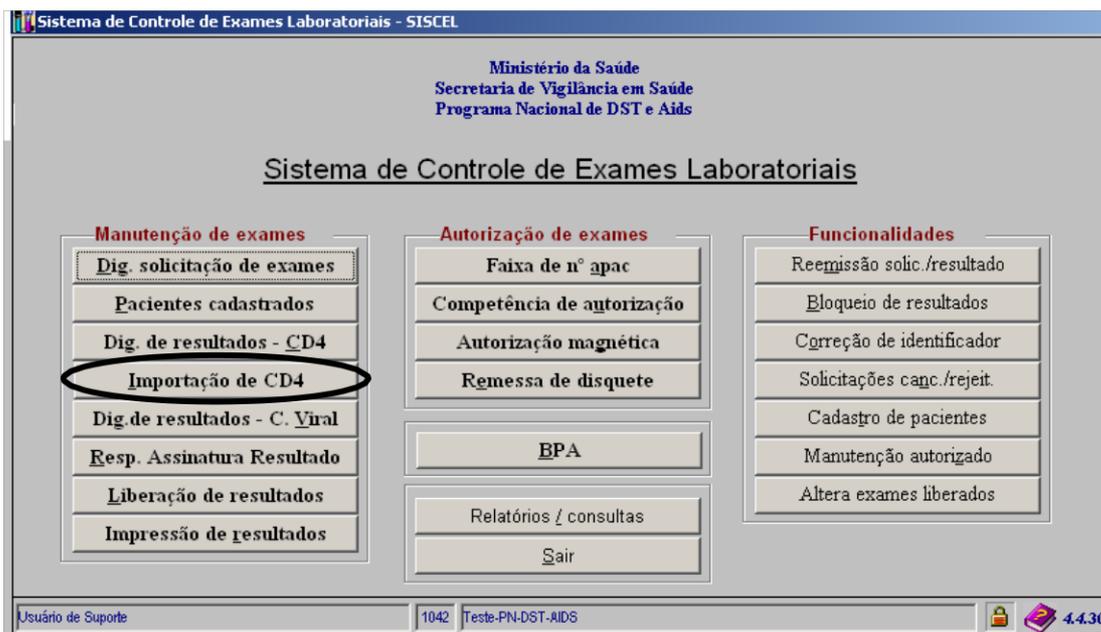
NOTA: É importante ressaltar que as rotinas passadas no equipamento ANTES da configuração do BD Multiset™ NÃO poderão ser exportadas.



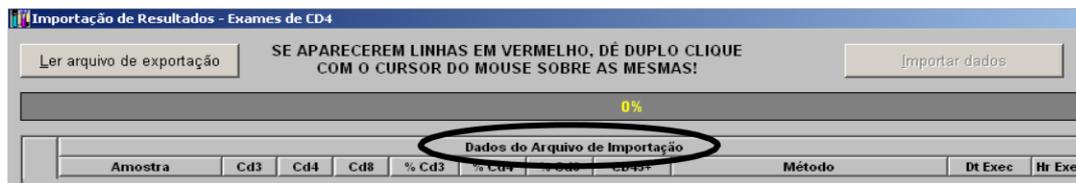
Importação de resultado – CD4

LEMBRE-SE: O IDENTIFICADOR DA AMOSTRA DIGITADA NO BD MULTISSET™ DEVE SER IGUAL AO IDENTIFICADOR DA AMOSTRA DIGITADA NO SISCEL, PARA O MESMO PACIENTE (SAMPLE ID = IDENTIFICADOR DA AMOSTRA).

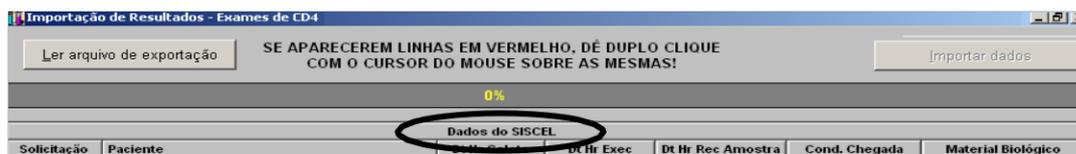
Para se ter acesso à tela de importação de resultados, acesse o SISCEL e pressione o botão “Importação de CD4”.



A seguinte tela aparecerá. Aqui está representada em duas partes:



e

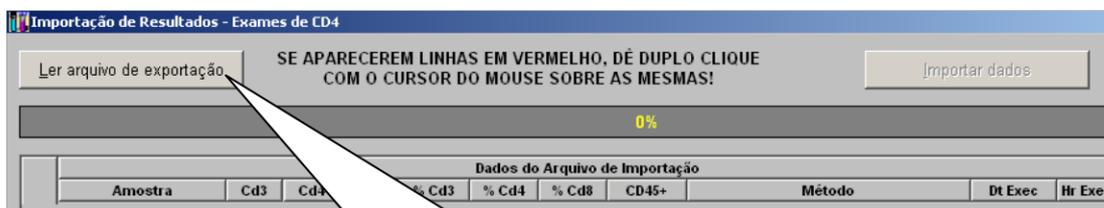


Localizando o arquivo exportado pelo BD Multiset™

Insira na porta USB da máquina que o SISCEL está instalado, o pen drive com o arquivo de resultados que foi gravado pelo BD Multiset™.



OU

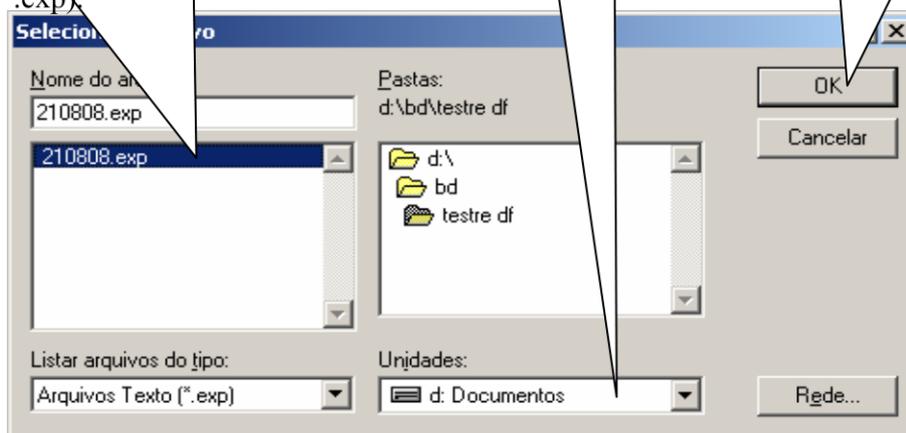


1. Clique no botão “Ler arquivo de exportação” e a seguinte tela aparecerá:

2. Selecione a unidade do pen drive.

3. Selecione o arquivo exportado pelo BD Multiset™ que está no pen drive.
(* .exp).

4. Clique no botão “OK”.



Identificando amostras no SISCEL

Ao clicar em “OK”, na janela anterior, os resultados dos exames que contam no pen drive serão mostrados na tela.

Dados do Arquivo de Importação											
	Amostra	Cd3	Cd4	Cd8	% Cd3	% Cd4	% Cd8	CD45+	Método	Dt Exec	Hr Exec
✓	1664	596	990	86,55	31,00	51,50	1922	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:49	
✓	2895	579	2254	86,31	17,26	67,20	3355	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:51	
✓	2350	1126	1142	68,09	32,63	33,09	3451	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:52	
✓	1032	270	666	63,46	16,60	40,95	1626	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:53	
✓	1688	411	1200	89,71	21,86	63,79	1882	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:50	
✓	1015	417	583	79,34	32,62	45,56	1279	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:54	
✓	909	135	749	81,00	12,05	66,76	1122	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:55	
✓	1180	29	1103	76,49	1,85	71,45	1543	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:56	
✓	1578	416	1046	60,56	15,98	40,15	2606	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:57	
✓	696	55	602	66,84	5,32	57,81	1041	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:58	
✓	1231	89	989	72,97	5,27	58,63	1687	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:59	
✓	1304	144	1104	78,95	8,72	66,81	1652	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:01	
✓	1849	930	585	69,33	34,87	21,93	2667	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:01	
✓	1424	253	1124	85,16	15,15	67,21	1672	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:02	
✓	1223	451	670	68,83	25,37	37,71	1777	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:03	
✓	1226	539	643	62,37	27,44	32,71	1965	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:03	
✓	1038	545	478	68,19	35,76	31,41	1523	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:04	
✓	726	362	340	57,00	28,38	26,67	1274	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:06	
✓	1094	519	507	73,67	34,96	34,13	1485	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:06	
✓	1800	397	1286	77,05	16,98	55,07	2336	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:07	

Automaticamente será iniciado o processo de localização das solicitações no SISCEL ().

LEMBRE-SE: O IDENTIFICADOR DA AMOSTRA EXPORTADA PELO BD MULTISSET™ DEVE SER IGUAL AO IDENTIFICADOR DA AMOSTRA NO SISCEL (SAMPLE ID = IDENTIFICADOR DA AMOSTRA).

Depois de localizado os paciente no SISCEL, na segunda parte da tela, os dados do paciente serão mostrados.

Dados do SISCEL						
Solicitação	Paciente	Dt Hr Coleta	Dt Hr Exec	Dt Hr Rec Amostra	Cond. Chegada	Material Biológico
1664	1664	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:49	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
2895	2895	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:51	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
2350	2350	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:52	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1032	1032	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:53	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1688	1688	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:50	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1015	1015	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:57	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
909	909	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:59	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1180	1180	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:52	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1578	1578	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:58	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
696	696	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:59	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1231	1231	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:52	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1304	1304	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:53	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1849	1849	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:50	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1424	1424	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:52	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1223	1223	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:53	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1226	1226	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:50	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1038	1038	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:52	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
726	726	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:53	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1094	1094	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:53	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total
1800	1800	21.08/2008 8:00	21.08/2008 14:50	21.08/2008 11:00	Adequada	Sangue Total



Selecionando exames para importação

Você pode selecionar os exames que deseja importar para o SISCEL. Basta marcar ou não, o exame.

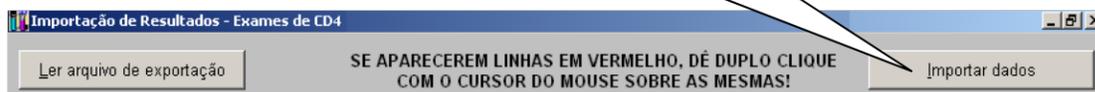
1. Os itens marcados serão importados para o SISCEL.

Dados do Arquivo de Importação											
	Amostra	Cd3	Cd4	Cd8	% Cd3	% Cd4	% Cd8	CD45+	Método	Dt Exec	Hr Exec
<input type="checkbox"/>		1664	596	990	86,55	31,00	51,50	1922	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:49
<input checked="" type="checkbox"/>		2895	579	2254	86,31	17,26	67,20	3355	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:51
<input type="checkbox"/>		2350	1126	1142	68,09	32,63	33,09	3451	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:52
<input checked="" type="checkbox"/>		1032	270	666	63,46	16,60	40,95	1626	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:53
<input type="checkbox"/>		1688	411	1200	89,71	21,86	63,79	1882	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:50
<input checked="" type="checkbox"/>		1015	417	583	79,34	32,62	45,56	1279	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:54
<input type="checkbox"/>		909	135	749	81,00	12,05	66,76	1122	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:55
<input type="checkbox"/>		1180	29	1103	76,49	1,85	71,45	1543	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:56
<input type="checkbox"/>		1578	416	1046	60,56	15,98	40,15	2606	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:57
<input checked="" type="checkbox"/>		696	55	602	66,84	5,32	57,81	1041	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:58
<input checked="" type="checkbox"/>		1231	89	989	72,97	5,27	58,63	1687	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	14:59
<input checked="" type="checkbox"/>		1304	144	1104	78,95	8,72	66,81	1652	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:01
<input checked="" type="checkbox"/>		1849	930	585	69,33	34,87	21,93	2667	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:01
<input checked="" type="checkbox"/>		1424	253	1124	85,16	15,15	67,21	1672	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:02
<input checked="" type="checkbox"/>		1223	451	670	68,83	25,37	37,71	1777	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:03
<input checked="" type="checkbox"/>		1226	539	643	62,37	27,44	32,71	1965	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:03
<input checked="" type="checkbox"/>		1038	545	478	68,19	35,76	31,41	1523	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:04
<input checked="" type="checkbox"/>		726	362	340	57,00	28,38	26,67	1274	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:06
<input checked="" type="checkbox"/>		1094	519	507	73,67	34,96	34,13	1485	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:06
<input checked="" type="checkbox"/>		1800	397	1286	77,05	16,98	55,07	2336	Citometria de Fluxo / Facscalibur - Multitest*	21.08/2008	15:07

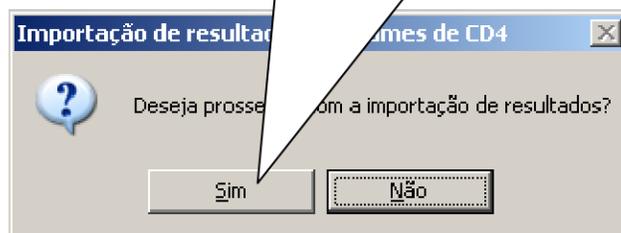


Importando resultado de exames do BD Multiset™ para o SISCEL

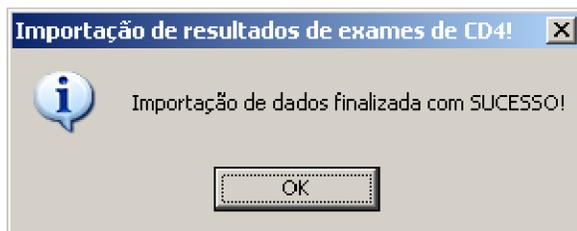
1. Após a seleção dos exames, pressione o botão “Importar dados”.



2. Pressione o botão “SIM” para continuar o procedimento de importação.



A janela de confirmação de importação efetuada com sucesso aparecerá.



Pressione o botão “OK”. Você poderá acessar a janela de digitação de resultados de CD4 e verificar que os exames foram importados ou ir diretamente para a janela de liberação de exames.

A rotina de importação de exames foi criada para agilizar a digitação dos resultados de exames de CD4. Os procedimentos de liberação e impressão continua sendo obrigatórios.

Problemas encontrados

Caso alguma linha de exame apareça em vermelho, dê um duplo clique sobre o nome do paciente e veja qual informação está faltando. Você pode corrigir o problema e fazer a importação ou deixar para incluir o resultado manualmente.

Uma situação que pode acontecer é: o exame ser feito e a solicitação de exames ainda não estar digitada no SISCEL. Nessa seção foi utilizada a referência 14, descrita nas referências desse documento.

