Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

BD FACSVia™

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

Módulo Básico

Depois de completar esse treinamento você será capaz de:

- Conhecer os conceitos da imunologia da infecção pelo HIV.
- Compreender os princípios da metodologia de Citometria de Fluxo.
- Compreender a composição e função dos reagentes usados na rotina.
- Realizar o controle de qualidade do instrumento.
- Preparar amostras para a rotina de CD4.
- Criar uma lista de trabalho.
- Gravar e analisar arquivos multicolor utilizando o Software Clínico BD FACSVia.
- Solucionar problemas que possam ocorrer durante a rotina laboratorial.

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Galdino, Nayane
de Oliveira, Vivian
Castro, Iris
Reis, Denise
Rizzo, Lucas Bortolotto
Sene, Reginaldo Vieira
Calmon, Flávia
Sant Anna, Maíra Macedo
Ricardi, Renata
Russo, Ricardo Toledo
Kuribayashi, Juliana Sayuri
da Silva, Vanessa Santos
Cavalcanti, Clara Maciel
Barros, Helena Cristina

Versão 3
Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+ – Módulo Básico - Plataforma BD FACSVia. -- São Paulo, 2021.
134 f.

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

AGENDA

Dia 1

9:00 às 10:30

- ✓ Imunologia/AIDS/Patogênese do HIV
- ✓ Princípios básicos da citometria de fluxo
- ✓ CQ na rotina CD4/CD8 (Fases) – Pré Analítica

10:30 às 10:45

- ✓ Intervalo

10:45 às 12:30

- ✓ Teoria: Fase Pré Analítica (Coleta e conservação da amostra) e Fase Analítica (Calibração)
- ✓ Prática: Apresentação do equipamento e Calibração
- ✓ Prática: Manutenções

12:30 às 13:30

- ✓ Almoço

13:30 às 15:30

- ✓ Teoria: Fase Analítica (preparo das amostras e controles)
- ✓ Prática: Preparo de amostras e controles

15:30 às 15:45

- ✓ Intervalo

15:45 às 17:00

- ✓ Prática: Aquisição de amostras e controles
- ✓ Resolução de exercícios

Dia 2

9:00 às 10:30

- ✓ Teoria: Fase Pós-Analítica (Interpretação dos resultados)
- ✓ Teoria: Problemas e Soluções (Calibração e Amostras)

10:30 às 10:45

- ✓ Intervalo

10:45 às 12:00

- ✓ Planilha de acompanhamento Trucount Controls e Regras de Westgard
- ✓ Resolução de exercícios e revisão

12:00 às 13:00

- ✓ Almoço

13:00 às 16:00

- ✓ Prova

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

ÍNDICE

GLOSSÁRIO....8
IMUNOLOGIA....11
LINFÓCITOS T CD4+ 15
LINFÓCITOS T CD8+ 16
IDENTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS 17
POR QUE UTILIZAMOS O CD45? 19
MARCADORES CD3/CD4/CD8 20
Figura 12: Linfócitos CD4+/- e CD8+/- (esquerda) e células CD4+/- e CD8+/-. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/. 21
Nessa seção foram utilizadas as referências 1, 2, 3 e 4 descritas no capítulo final desse documento. 21
EXERCÍCIOS 1 21
SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (Aids)....24
CICLO DE VIDA DO HIV....24
PATOGÊNESE DO HIV 25
QUANTIFICAÇÃO DE LTCD4+ E OBJETIVOS DO TRATAMENTO 27
EXERCÍCIOS 2 31
PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CITOMETRIA DE FLUXO 32
SISTEMAS 35
VISUALIZAÇÃO DOS DADOS NO BD FACSVia CLINICAL SOFTWARE 40
APRESENTAÇÃO DO EQUIPAMENTO 40
As informações apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 2: About the system....42
PREPARO DAS SOLUÇÕES E INICIALIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO....43
As informações apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 3: Startup and shutdown 44
EXERCÍCIOS 3 45
CONTROLE DE QUALIDADE NA ROTINA DE QUANTIFICAÇÃO CD4/CD8 46
FASE PRÉ ANALÍTICA....46
FASE ANALÍTICA 48
Controle de qualidade instrumental/Calibração 48
Preparo do BD CS&T 48
Procedimentos para Calibração: 49
Ajustando as regiões 51
Interpretação do QC Report 53
Instalação de um novo lote de esferas 53

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

As informações apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 4: Quality control 55
EXERCÍCIOS 4 56
PREPARO DAS AMOSTRAS E CONTROLES 57
Preparo das amostras 57
Preparo dos Controles 58
BD FACSVia SOFTWARE e Aquisição de amostras 59
FASE PÓS-ANALÍTICA 67
Interpretação de resultados 67
Amostras 67
Controles 72
Regras de Westgard na rotina CD4/CD8 73
Fluxograma das Regras de Westgard 74
As informações técnicas apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 5: Data Acqisition e no manual “BD FACSVia CD4 Application Guide” na sessão BD Multitest assays. 75
EXERCÍCIOS 5 76
LIMPEZA E MANUTENÇÃO DO EQUIPAMENTO 78
MANUTENÇÕES DIÁRIAS 78
Manutenção após aquisição e desligamento: 78
Retrolavagem da SIP (Backflush) 79
Limpeza da SIP (SIP Clean): 79
Limpeza do sistema de fluidos: 80
MANUTENÇÕES PROGRAMADAS: 80
Limpeza dos tanques de fluido: 81
Substituição dos filtros dos tanques de fluido: 81
Substituição do filtro em linha de Solução de sheath: 82
Substituição da tubulação de bomba peristáltica: 84
MANUTENÇÕES EXTRAS (REALIZADAS SOMENTE APÓS ORIENTAÇÃO TÉCNICA DA BD) 86
Esvaziamento das linhas de sensores de fluidos: 86
Desobstrução da SIP: 87
As informações técnicas apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 6: Maintenance 89
EXERCÍCIOS 6 90
ETAPAS IMPORTANTES PARA GARANTIR A QUALIDADE NO LABORATÓRIO 91
Realizar o Controle da Qualidade (QC) 91
Realizar a Garantia da Qualidade (QA) 91
Triagem das Amostras 91
Checklist da triagem 91
Preparo das amostras: 92

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Armazenamento dos reagentes: 92
Preparo das Soluções: 93
PROBLEMAS E SOLUÇÕES 94
Solução de problemas de hardware: 94
Solução de problemas de software: 99
Solução de problemas de aquisição: 101
Solução de problemas de CQ: 107
As informações técnicas apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 8: Troubleshooting 108
Solução de problemas nas amostras e controles: 109
Lipemia 109
Aglutininas 110
Protocolo de centrifugação e substituição do volume plasmático 111
Protocolo de remoção do plasma 112
Ausência de monoclonal 113
Lise dos eritrócitos 113
EXERCÍCIOS 7 114
SEGURANÇA E SAÚDE NO LABORATÓRIO 116
Precauções Universais 116
Descarte de Material Contaminado 116
Rotulagem Preventiva 117
Risco Químico 117
GERENCIAMENTO DE ARQUIVOS 118
EXPORTAÇÃO DE RESULTADOS PARA O SISCEL 119
MATERIAL ADICIONAL 120
GUIA DE PIPETAGEM REVERSA 121
Utilização da pipeta de repetição 124
DICAS DE PIPETAGEM 127
GUIA DE LIMPEZA DA PIPETMAN 130
REFERÊNCIAS 133

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

GLOSSÁRIO

- **BD CS&T –** Partículas (*beads* – esferas de poliestireno) marcadas com fluorocromos usadas para verificar qualidade dos componentes óticos, eletrônicos e fluídicos do equipamento. As esferas permitem ao software medir a sensibilidade de cada detector de fluorescência e otimizar as definições de compensação.

- **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 intesidade de luz maior para gerar sinal elétrico. Detector de tamanho (FSC) e de granulosidade/complexidade interna (SSC).

  - Fotomultiplicador (PMTs) - mais sensível e desta forma precisa de intensidade de luz menor para gerar sinal elétrico. Detectores de Fluorescências e granulosidade/complexidade interna. No FACSVia 4 cores, temos os seguintes PMTs: FL1 (identifica FITC), FL2 (identifica PE), FL3 (identifica PerCP) e FL4 (identifica APC).

- **Dot plot –** Gráfico de pontos, que representam as populações celulares no laboratory report emitido para cada amostra durante a rotina.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

- **Filtros dos tanques de fluidos:** Cada tanque de solução Sheath, BD FACSClean e detergente contém um disco de filtro responsável por filtrá-la antes de sua entrada no equipamento. Isto reduz a quantidade de debris nas soluções**.**

  (As informações contidas neste tópico foram baseadas nas descrições presentes na página 122, seção "Substituição dos filtros de tanques de fluidos" do manual de "Intruções de Uso do Sistema BD FACSVia")

- **Filtro em linha:** Filtro adicional para filtragem da solução de sheath. Isto reduz a quantidade de debris na solução.

  (As informações contidas neste tópico foram baseadas nas descrições presentes na página 124, seção "Substituição do filtro de solução salina em linha" do manual de "Intruções de Uso do Sistema BD FACSVia")

- **Fluorocromos (FITC, PE, PerCP, APC) –** Partículas associadas aos anticorpos que emitem fluorescência ao entrarem em contato com o laser. No FACSVia da Rede do Ministério, usamos FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), PerCP (peridinin clorophil protein) e APC (aloficocianina).

- **FL (1,2,3,4) –** Medida proveniente 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 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. Relatório que contém os gráficos (dot plots).

- **BD FACSVia™ clinical software –** Software clínico utilizado no FACSVia para leitura de amostras da rotina.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

- **Multitest –** 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.

- **Probe –** Peça do FACSVia onde colocamos os tubos de amostra para leitura. Também é chamado de tubo de injeção de amostra ou SIP.

- **Solução de Lise –** Reagente usado durante a preparo de amostras para leitura no FACSVia que lisa as hemácias.

- **SSC -** Detector do tipo fotodiodo que identifica granulosidade ou complexidade das células ou partículas.

- **Trucount Control –** Nome dado ao controle que fazemos na rotina para verificarmos pipetagem e as *beads* dos tubos trucount. São partículas (*beads*) em diferentes quantidades (low, medium e high) que são adicionadas ao final do preparo de três determinadas amostras para realização do referido controle.

- **Tubos Trucount -** Tubos usados para preparo de amostras da rotina que contêm *beads* de referência no fundo para realização da contagem absoluta de leucócitos no sangue.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

IMUNOLOGIA

Imunologia é a ciência que estuda o funcionamento do Sistema Imunológico (também conhecido como Sistema Imune ou Sistema Imunitário) na fisiologia (condições normais de funcionamento do organismo) e na patologia (doença). Podemos afirmar, porém, que o Sistema Imunológico é muito mais estudado na patologia do que na fisiologia.

A história da Imunologia passa por grandes nomes da ciência, tais como: Metchnikoff, que descreveu a fagocitose e algumas das células que possuem tal capacidade (macrófagos); Behring e Kitasato, que trabalharam na descrição dos anticorpos.

Para compreender o Sistema Imunológico (SI), vamos comentar um pouco sobre seus componentes, sua localização e sua função. Diferente da maioria dos sistemas do organismo, o SI não é um mero conjunto de órgãos conectados em um determinado local realizando uma função bem determinada.

O SI é composto por células, tecidos, órgãos, fatores solúveis, vasos e fluidos que correm nestes vasos e as células que o compõem são os glóbulos brancos do sangue, conhecidos como leucócitos, além de outras células que só estão presentes em tecidos não sanguíneos. Dentre as células do SI, podemos citar os granulócitos, o sistema mononuclear fagocítico, as células dendríticas, os mastócitos e os linfócitos.

Os linfócitos – objeto de nosso estudo neste treinamento – podem ser de três tipos: linfócitos B, linfócitos T e células *natural killer* (NK). As células NK fazem parte da primeira linha de defesa do organismo, o sistema imune inato, e são capazes de matar outras células, como células tumorais, por exemplo. Os linfócitos B e T por sua vez, fazem parte do sistema imune especializado, o sistema imune adaptativo. Os linfócitos B – os quais compreendem três subpopulações (B-1, B-2 e células B da zona marginal) – podem se diferenciar em células com alta capacidade de produção de anticorpos, chamadas plasmócitos. Os linfócitos T – os quais compreendem as subpopulações T *helper* ou auxiliar, T citotóxico, e T duplo-positivo – são células que reconhecem antígenos desde que apresentados por outras células, as chamadas apresentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos, e linfócitos B). À medida que passam pelo processo de maturação, os linfócitos T primeiro são duplo-positivos (sem uma função definida), para depois se diferenciarem em T auxiliares ou T citotóxicos.

As células do SI se originam da medula óssea, vindas de uma célula-tronco já comprometida com o desenvolvimento de leucócitos e hemácias, conhecida como célula-tronco hematopoética. À medida que as células-tronco vão se dividindo, vão também se diferenciando em progenitores, que podem ser o progenitor linfóide ou o progenitor mielóide. O progenitor mielóide, ao passo que vai se dividindo, vai também se diferenciando, de modo a originar precursores que darão origem a hemácias, plaquetas, monócitos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). O progenitor linfóide, enquanto se divide, diferencia-se em precursores que

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

darão origem aos linfócitos T, aos linfócitos B e às células NK. Os linfócitos, como mencionado anteriormente, serão o foco de nosso treinamento. Veja um resumo da origem das células do sistema imunológico na figura 1.

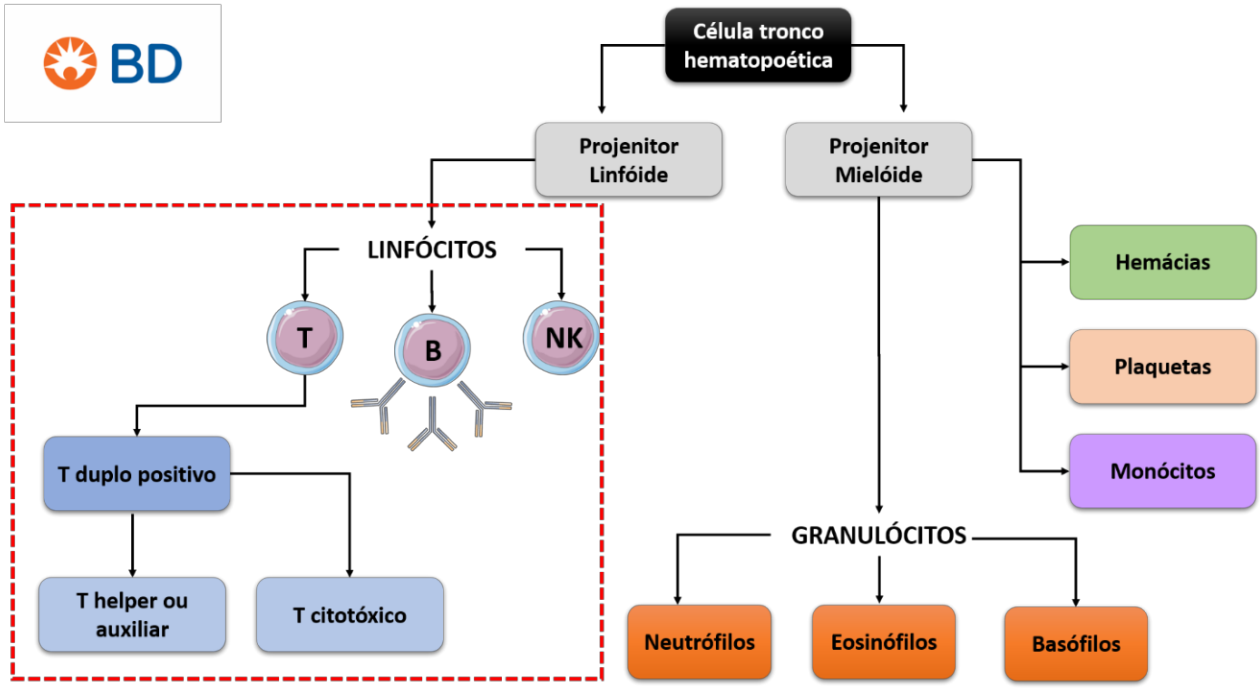


Figura 1: Origem das células do Sistema Imune.

Veja na figura 2 a comparação das células linfóides sob microscopia óptica (à esquerda) e sob microscopia eletrônica (à direita).

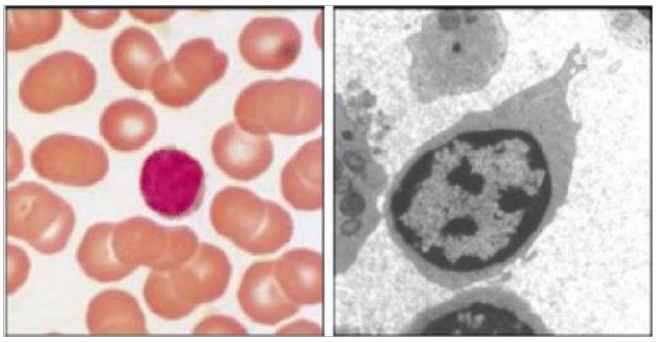


Figura 2: Comparação de células linfóides por microscopia óptica e eletrônica. Fonte: Adaptado de MURPHY, Kenneth et al. Imunobiologia de Janeway. 7. ed. Porto Alegre: Artmed®, 2010. 899 p.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

A figura 3 mostra a análise comparativa das células do sistema imunológico (granulócitos, os monócitos e os linfócitos) quanto ao tamanho, à complexidade e à granulosidade celular. É possível notar que, relativamente, os linfócitos têm um tamanho menor que os demais leucócitos. Os monócitos são maiores que os linfócitos e os granulócitos têm tamanho variável, porém também maior que os linfócitos. Considerando a granulosidade ou a complexidade, vemos que os linfócitos são, relativamente, as células menos granulosas e menos complexas; já os granulócitos são – como seu próprio nome já diz – mais granulosos e complexos (observe os núcleos destas células); os monócitos, por sua vez, têm, em relação às outras duas populações, média granulosidade e média complexidade.

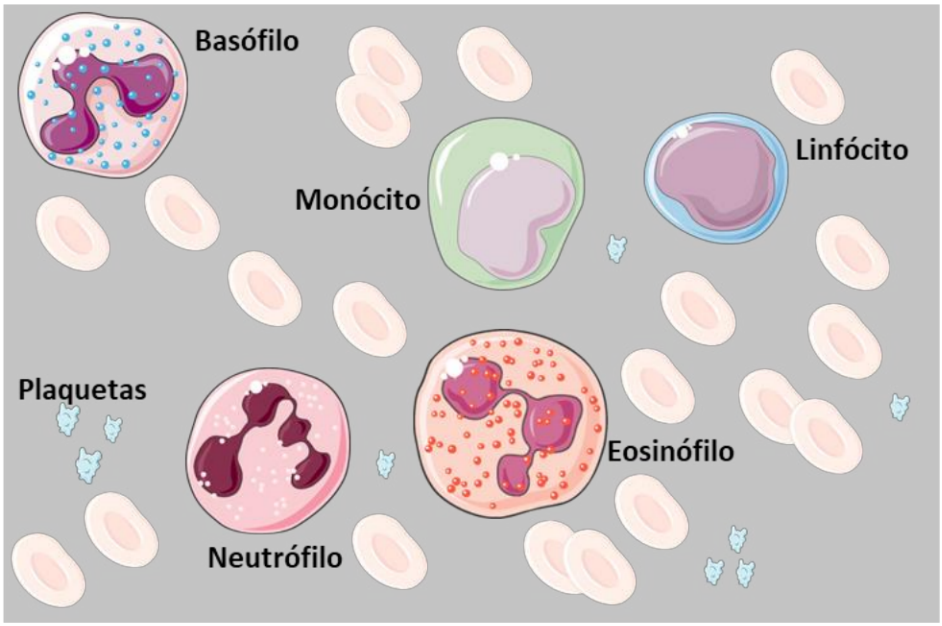


Figura 3: Microscopia óptica de leucócitos – Esfregaço sanguíneo. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/

O SI está presente em praticamente todo o organismo. Esta é mais uma das características que fazem do SI um sistema bem peculiar. Veja a figura 4.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

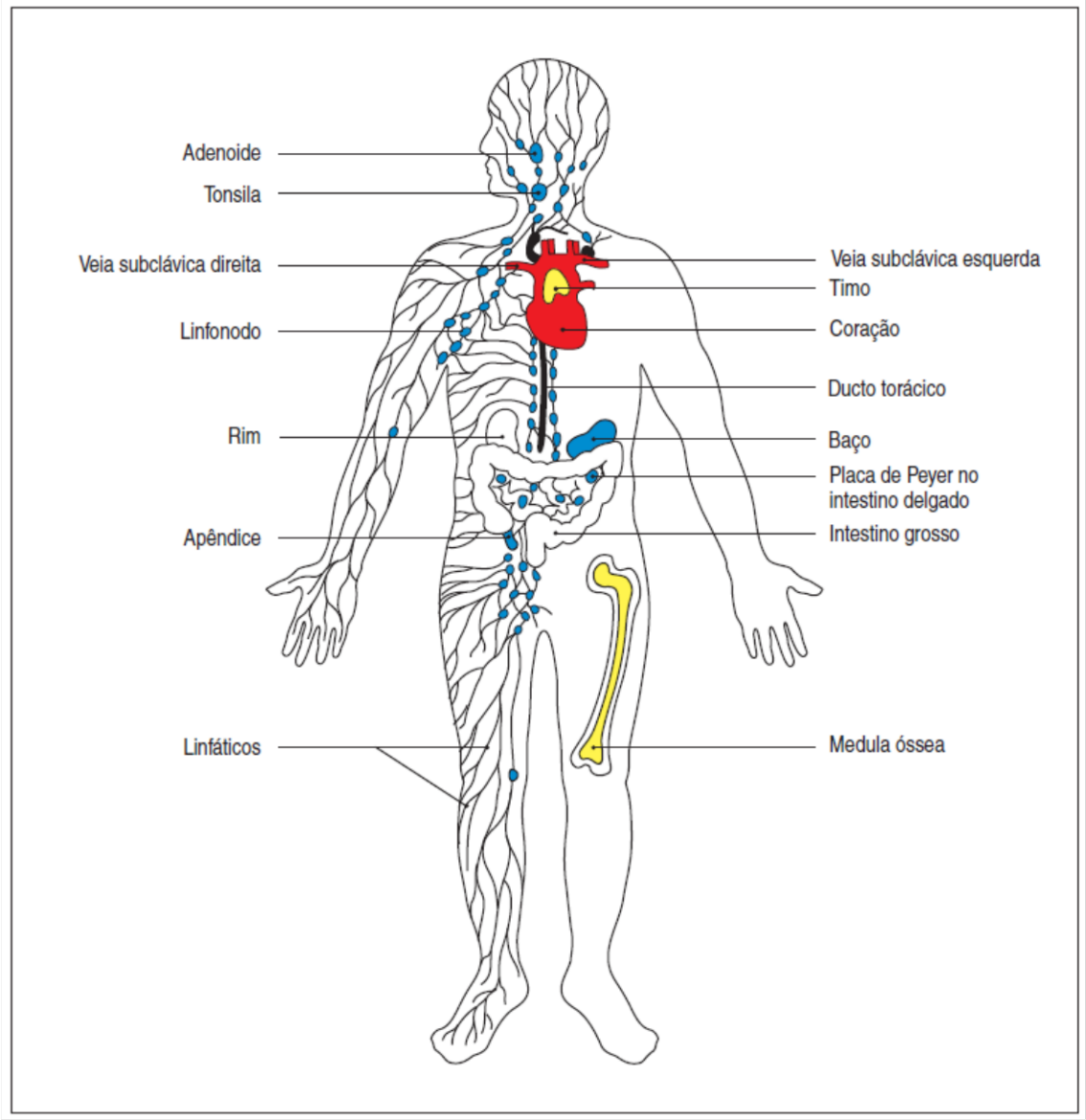


Figura 5: Distribuição do sistema imunológico no organismo. Fonte: MURPHY, Kenneth et al. Imunobiologia de Janeway. 7. ed. Porto Alegre: Artmed®, 2010. 899 p.

O SI é composto de mensageiros químicos, células circulatórias e órgãos que atuam de forma cooperativa na manutenção da homeostasia (equilíbrio) do organismo.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

LINFÓCITOS T CD4+

Os linfócitos T *helper* ou auxiliares (T CD4+) tem uma função importantíssima no SI: são os "maestros" da resposta imune, pois modulam-na por meio da secreção de citocinas que ativam ou inibem todas as demais células do SI, como: linfócitos T CD8+, linfócitos B, células NK, macrófagos, monócitos, granulócitos, mastócitos e células dendríticas. Assim, os linfócitos T auxiliares atuam como verdadeiros comandantes do SI, direcionando a resposta imune adaptativa de acordo com o antígeno por eles reconhecido.

Após o reconhecimento do antígeno, os linfócitos T *helper* se diferenciam em quatro tipos de células efetoras, sendo as principais Th1 e Th2 (figura 5), há ainda Th17 e Treg. Ao se diferenciarem, os linfócitos T auxiliares proliferam, gerando mais células efetoras e células de memória, que são capazes de manter-se por anos, ativando-se num contato futuro com aquele antígeno.

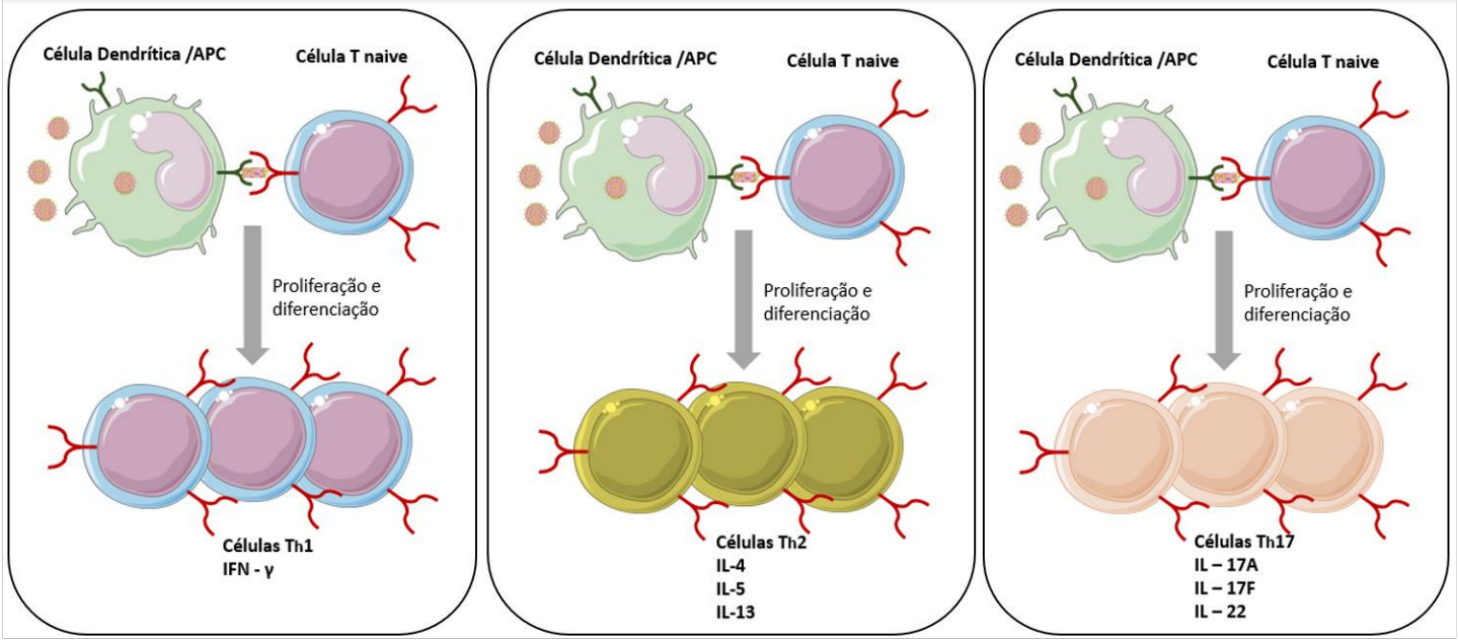


Figura 5: Subpopulações de linfócitos T helper. Fonte: Adaptado de Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e molecular. Elsevier, 7ª ed. 2012. A ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

LINFÓCITOS T CD8+

Os linfócitos T citotóxicos (T CD8+), por sua vez, têm a propriedade da citotoxicidade, isto é, de matar uma célula-alvo, desde que reconhecida especificamente como infectada ou tumoral. Por exemplo, um linfócito T auxiliar infectado pelo HIV expressa em sua superfície antígenos do vírus e pode ser reconhecido por um linfócito T citotóxico, que, ao fazê-lo, degranula, liberando citotoxinas conhecidas como perforina e granzima. A perforina tem a capacidade de gerar poros na membrana plasmática da célula-alvo por onde a granzima acessa o meio intracelular e induz a ativação de proteínas responsáveis pela morte celular programada (apoptose). Na figura 7 é possível observar uma representação esquemática de como ocorre a expressão de antígenos virais na superfície das células hospedeiras (acima) e o reconhecimento e a citotoxicidade pelas células T citotóxicas (abaixo).

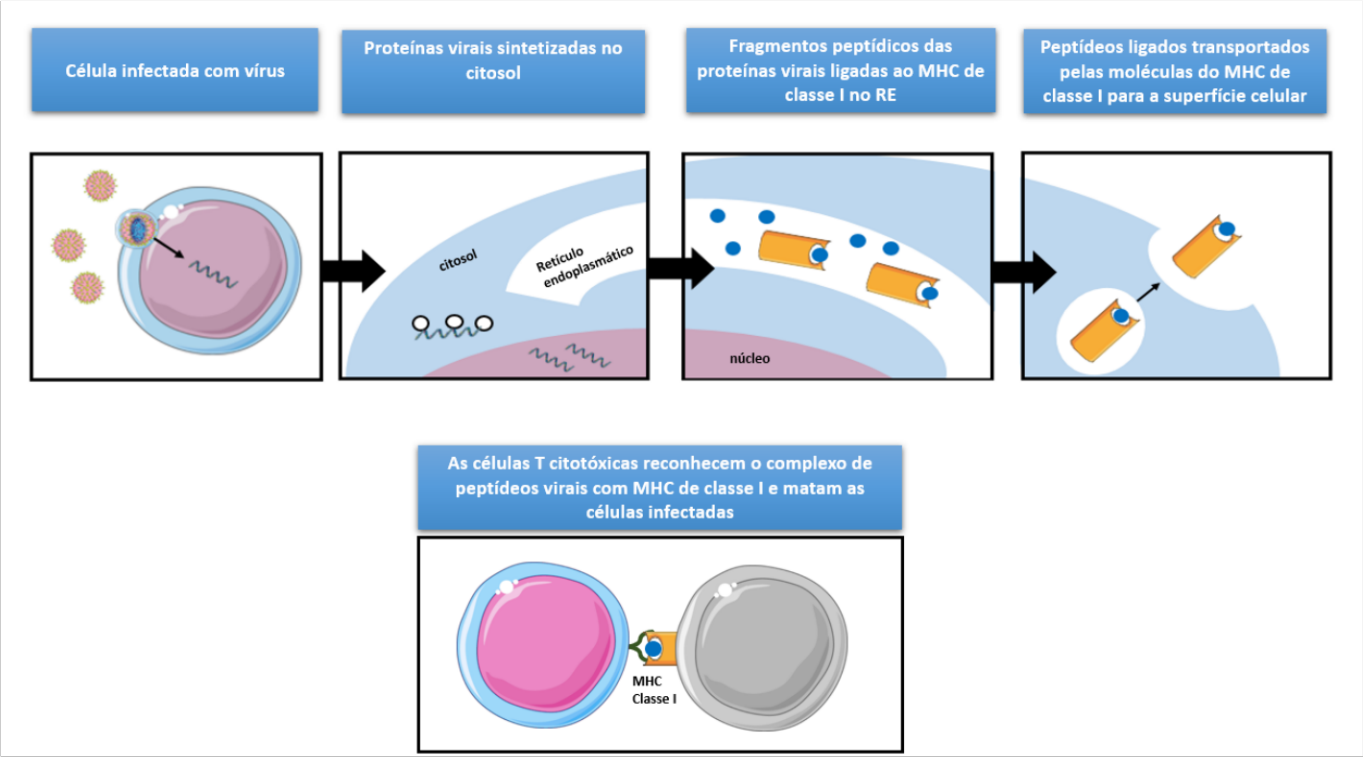


Figura 6: Expressão de antígenos virais e reconhecimento da célula-alvo pelo linfócito T citotóxico. Fonte: MURPHY, Kenneth et al. Imunobiologia de Janeway. 7. ed. Porto Alegre: Artmed®, 2010. 899 p. A ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

IDENTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS

Na figura 7 é possível identificar facilmente um monócito, três granulócitos e um linfócito. Mas é possível dizer qual é a subpoplação de linfócito? Seria este um linfócito B, uma célula NK ou um linfócito T? Se fosse um linfócito T, seria um T auxiliar ou T citotóxico? Como poderíamos identificá-los?

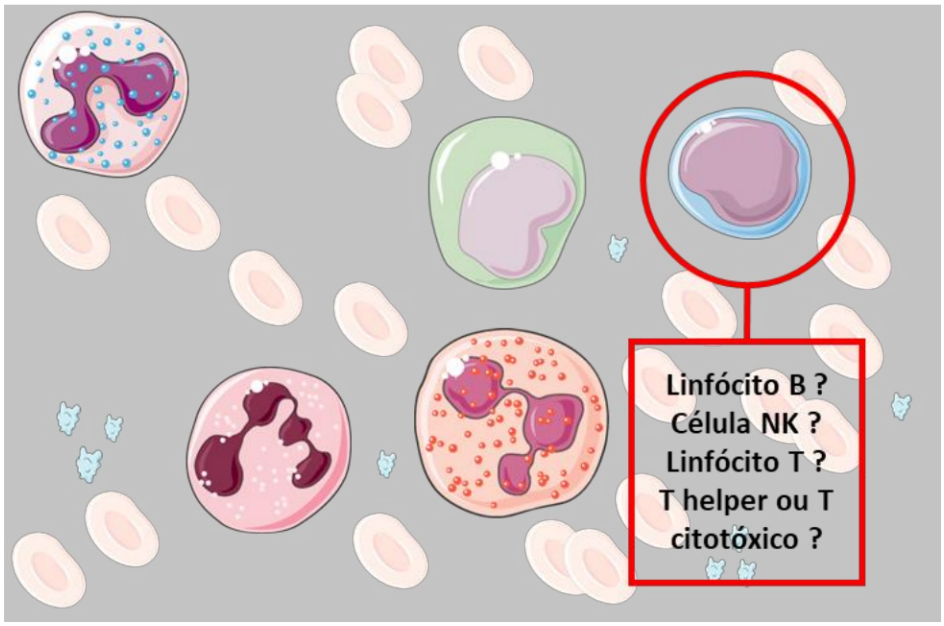


Figura 7: Identificação dos linfócitos. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

Para identificar os linfócitos – e não só estes, mas todas as células –, usamos os marcadores de superfície. À medida que os leucócitos vão se desenvolvendo, passam a ter (expressar) em sua membrana plasmática (superfície) certas moléculas que representam o comprometimento com uma determinada linhagem de células. Estas moléculas são chamadas de marcadores ou receptores de superfície e são identificadas pela sigla CD (*cluster of differentiation*) acompanhadas por um número (ex.: CD4). Se uma célula expressa um determinado marcador, é chamada de positiva para este marcador (ex.: CD4+); se não o expressa, é chamada de negativa para tal marcador (ex.: CD4-). A combinação destes marcadores serve para identificar uma célula (ex.: uma célula CD45+CD3+CD4-CD8+ é um linfócito T citotóxico).

Segundo o modelo de Singer-Nicholson, representado no esquema da figura 9, a membrana plasmática é composta por uma bicamada de fosfolipídeos com proteínas e glicoproteínas imersas nesta bicamada. As proteínas e glicoproteínas são os marcadores de superfície.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

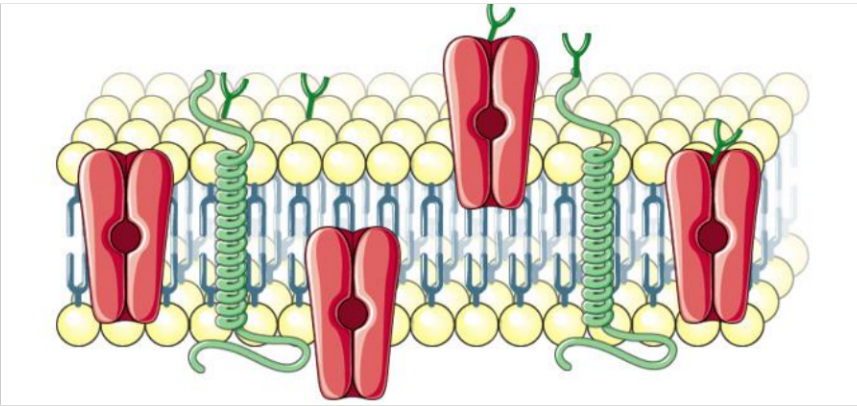


Figura 8: Marcadores de Superfície. Fonte:Adaptado de MURPHY, Kenneth. Imunobiologia de Janeway. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. A ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

Um dos marcadores de superfície que usaremos em nossa rotina é o CD45. Todos os leucócitos expressam CD45, portanto os linfócitos B e T, as células NK, os granulócitos e os monócitos são CD45+. Por esta razão, dizemos que o CD45 é um marcador pan-leucocitário.

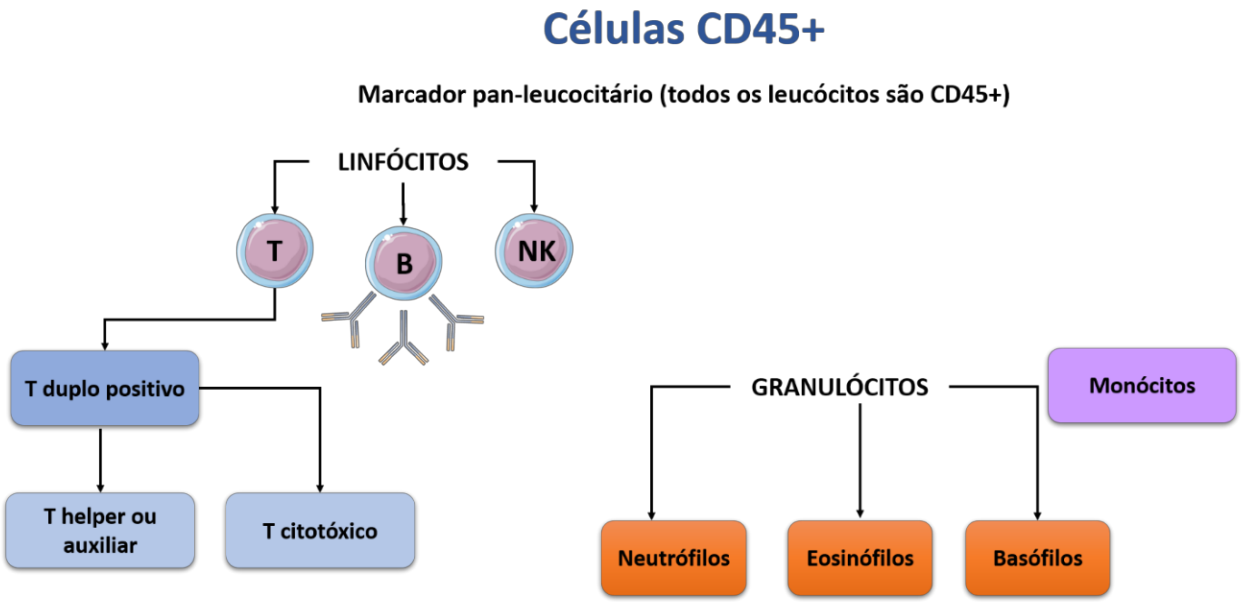


Figura 9: Células CD45 positivas.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Mas se todos os leucócitos são CD45+, para que utilizamos este marcador? Apesar de todos os leucócitos serem CD45+, a intensidade relativa de expressão deste marcador pode nos dizer quais células são os granulócitos, quais são os monócitos e quais são os linfócitos, pois ele é expresso diferencialmente nestas populações. Se compararmos as três populações quanto à expressão de CD45, veremos que, relativamente, os linfócitos expressam em maior intensidade este marcador. Os granulócitos expressam CD45 em menor intensidade e os monócitos, em intensidade intermediária. Em resumo, todos os leucócitos expressam CD45, mas os linfócitos o expressam em maior intensidade. Veja a figura 10.

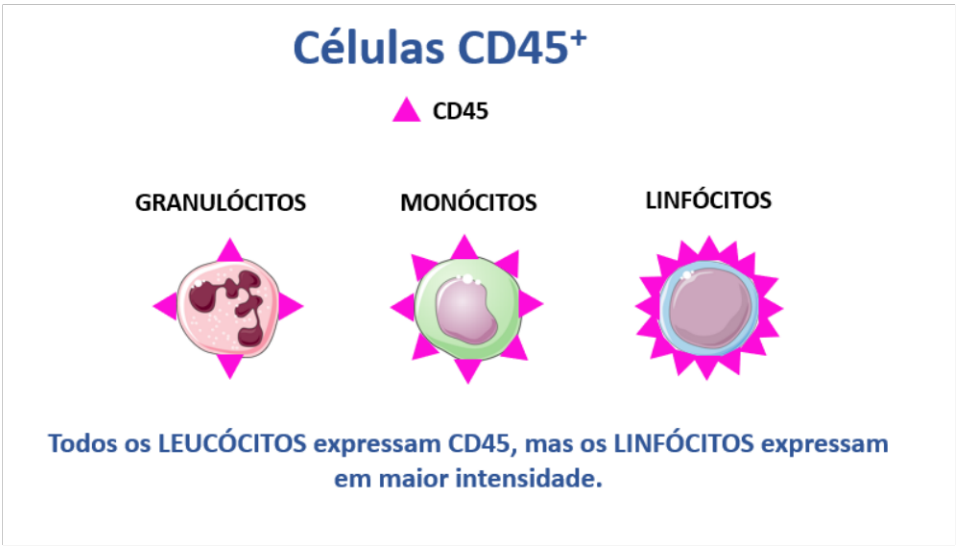


Figura 10: Nível de expressão de CD45. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

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

POR QUE UTILIZAMOS O CD45?

Porque o CD45 permite contar o total de linfócitos (T, B e NK) pela citometria de fluxo, sem a necessidade do hemograma. Assim, podemos obter a porcentagem de linfócitos T *helper*, T citotóxicos e T duplo-positivos dentre todos os linfócitos, não somente dentre os linfócitos T. Essas porcentagens, bem como a contagem absoluta de linfócitos totais são improtantes para os clínicos porque, entre outras aplicações, permitem-lhes determinar se o paciente tem uma queda especificamente de linfócitos T auxiliares (o que é causado pelo HIV) ou se tem uma queda geral dos linfócitos (o que poderia ser causado por outra patologia).

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

MARCADORES CD3/CD4/CD8

O marcador CD3 nos permite diferenciar os linfócitos T de todos os outros linfócitos (linfócitos B e células NK). Veja na figura 11, uma representação de células CD3+ e CD3-.

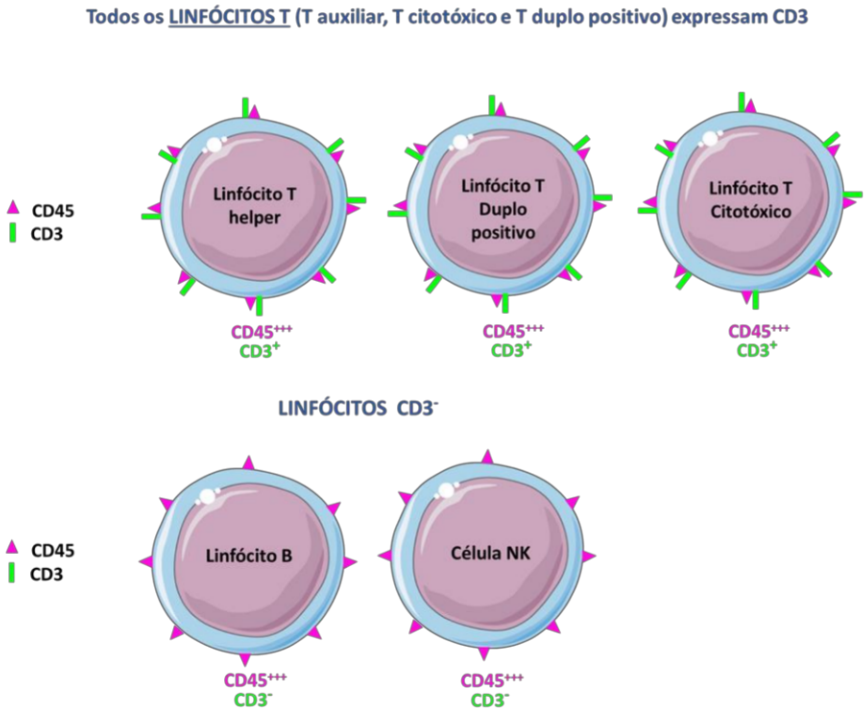


Figura 11: Linfócitos CD3+ (esquerda) e linfócitos CD3 – (abaixo). Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

Avaliando a população linfocitária (células $CD45^{+++}$) com relação a expressão de CD3, CD4 e CD8 é possível encontrar o perfil mostrado na figura 12 (esquerda). Na mesma figura (direita) é possível visualizar células que expressam CD4 e CD8, porém não expressam CD3. Sendo assim, a diferenciação entre monócitos e linfócitos T helper pode ser feita utilizando os seguintes parâmetros: SSC, nível de expressão de CD45, expressão de CD3 e nível de expressão de CD4. Os linfócitos T citotóxicos, por outro lado podem ser diferenciados das células NK utilizando-se a expressão de CD3.

Figura 13: Linfócitos $CD4^{+/-}$ e $CD8^{+/-}$ (esquerda) e células $CD4^{+/-}$ e $CD8^{+/-}$

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

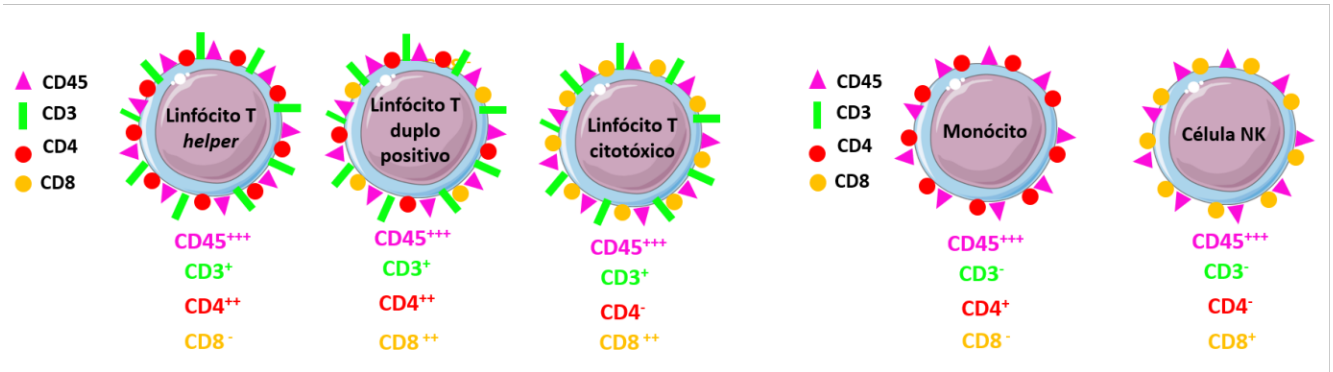


Figura 12: Linfócitos CD4+/- e CD8+/- (esquerda) e células CD4+/- e CD8+/-. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

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

EXERCÍCIOS 1

1. 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.

2. Dentre as células sanguíneas, quais são as células do sistema imune?

   _____

   _____

3. Quais são as subpopulações de linfócitos?

   _____

   _____

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

4. Quais são as subpopulações de linfócitos T?

_____

_____

5. Que marcador de superfície identifica os linfócitos T?

_____

6. Que células são positivas para CD45?

_____

_____

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

7. Considerando apenas marcação por CD45, como podemos identificar os linfócitos numa amostra de sangue total?

_____
_____
_____
_____
_____

8. Utilizando a combinação de marcadores de superfície, como podemos identificar os linfócitos T, os linfócitos T helper, os linfócitos T citotóxicos e os linfócitos T duplo-positivos?

_____
_____
_____
_____
_____
_____

9. Quais são as vantagem de se usar o CD45 na contagem de linfócitos T helper e T citotóxicos por citometria de fluxo?

_____
_____
_____
_____
_____
_____

10. Quais células do sistema imune expressam CD8?

_____
_____
_____

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 immunedefficiency virus* – HIV) era o agente causador da aids.

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). 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 gp 41 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 foi dito anteriormente, 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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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.

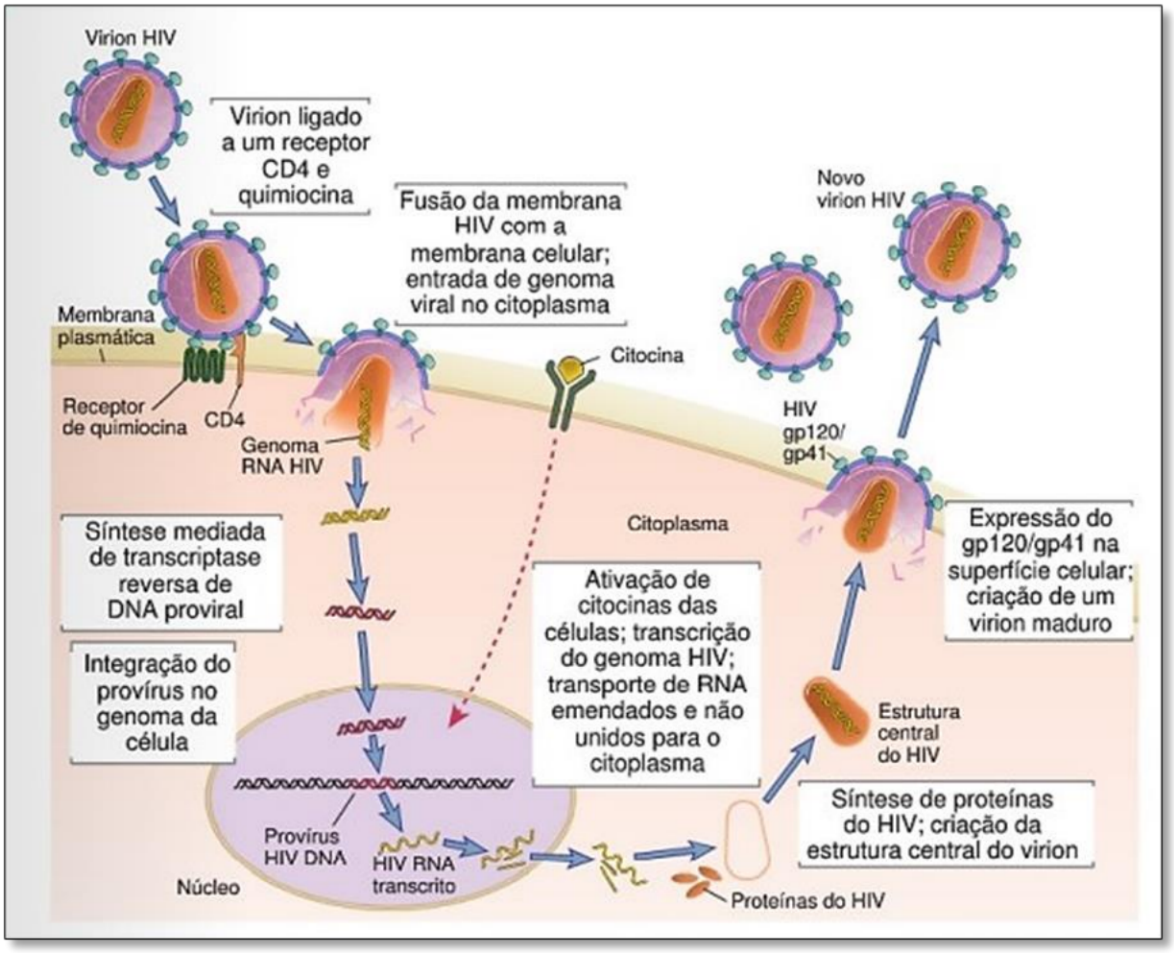


Figura 13: Ciclo de reprodução do virus HIV. Fonte: Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 7ª ed. 2012.

Nessa seção foram utilizadas as referências 1, 2, 5 e 6 descritas no capítulo final desse documento.

PATOGÊNESE DO HIV

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 a pessoa vivendo com HIV (PVHIV) entra em estado de imunodeficiência, fica suscetível a uma série de tumores e outras infecções que normalmente não se estabeleceriam em um 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 representada na figura 15, 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 **sídrome 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 conseqüência, a contagem de células T *helper* pára de cair, 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, a PVHIV fica muito suscetível a infecções oportunistas e tumores - ou seja, imunodeficiente – e por isto dizemos que o sujeito "entrou em Aids".

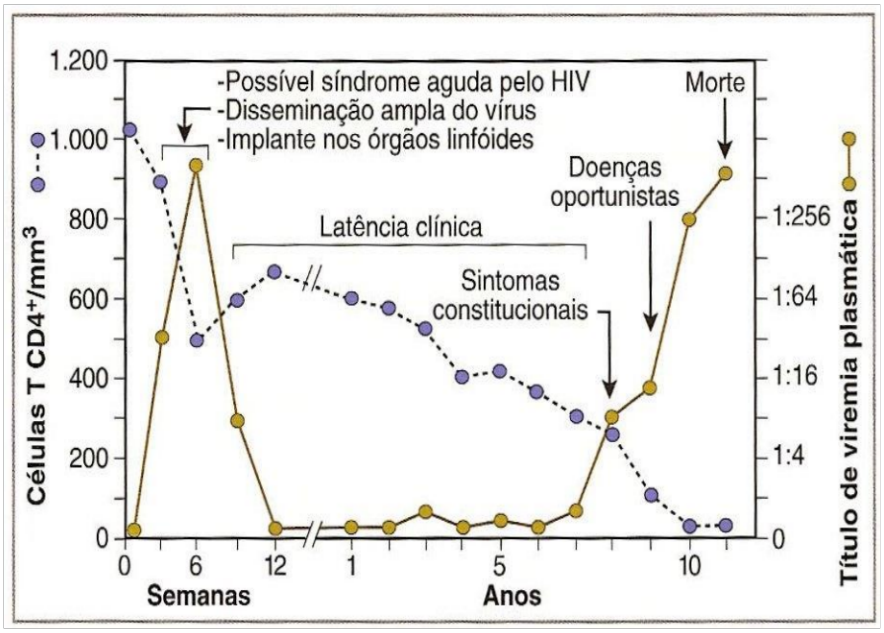


Figura 14: Contagem de LT CD4+ vs Viremia plasmática. Fonte: Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 7ª ed. 2012.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Durante a trajetória da infecção, inicialmente há uma queda brusca de linfócitos T *helper* (T CD4+). Tal queda pode ser seguida por um aumento da contagem de linfócitos T citotóxicos (T CD8+), responsáveis pela resposta imune específica contra o HIV. A contagem de linfócitos T citotóxicos, então, se estabiliza nesse patamar superior, mantendo a resposta e, mantém a contagem de linfócitos T helper. Na fase final da doença (Aids), a contagem de células T CD8+ diminui, voltando ao patamar inicial. Porém a contagem de células T CD4+ volta a cair, a partir do baixo valor que permaneceu na fase de latência clínica. Se olharmos todos os linfócitos T (linfócitos CD3+), veremos que a queda só ocorre quando a infecção evolui para Aids, o que se deve ao equilíbrio entre as subpopulações CD8+ e CD4+.

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, 5 e 6 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 infecção pelo HIV. A carga viral é considerada o padrão-ouro para monitorar a eficácia e adesão ao tratamento. Por outro lado, a contagem de LTCD4+ é utilizada como biomarcador do estado imunológico da PVHIV.

A contagem de LTCD4+ faz parte do quadro de exames laboratóriais a serem solicitados desde a primeira consulta e é fundamental para avaliar a urgência de início da terapia antirretroviral (TARV). Além disso, a quantificação de LTCD4+ também é solicitada durante o período de acompanhamento da doença e para avaliar indicação de vacinação e de profilaxia contra infecções oportunistas.

A avaliação da carga viral e da contagem de LTCD4+ auxília o clínico responsável na decisão e modificação do tratamento. Como servem para monitorar a saúde de quem toma os antirretrovirais ou não, o Consenso de Terapia Antirretroviral recomenda que esses exames sejam realizados a cada seis meses ou com uma maior frequencia dependendo do quadro clínico e da determinação do médico responsável.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

A) Frequência de solicitação de exame de contagem de LTCD4+ para monitoramento laboratorial de PVHIV, de acordo com a situação clínica

SITUAÇÃO CLÍNICA	CONTAGEM DE LT-CD4+	FREQUÊNCIA DE SOLICITAÇÃO
PVHIV com: › Em uso de TARV; e › Assintomática; e › Com carga viral indetectável	CD4 <350 céls/mm^3	A cada 6 meses[b]
	CD4 >350 céls/mm^3 em dois exames consecutivos, com pelo menos 6 meses de intervalo	Não solicitar
PVHIV que NÃO apresentem as condições acima, tais como: › Sem uso de TARV; ou › Evento clínico[a]; ou › Em falha virológica	Qualquer valor de LT-CD4+	A cada 6 meses[b]

Fonte: DIAHV/SVS/MS.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018. 412 p. : il. ISBN 978-85-334-2640-5

A vacinação é indicada para a PVHIV desde que ela não apresente deficiência imunológica importante. Essa consideração é importante, tendo em vista que um alto grau de imunodeficiência reduz a capacidade do paciente em montar uma resposta imunológica adequada. Assim, o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV do Ministério da Saúde recomenda adiar a administração de vacinas em pacientes sintomáticos ou com imunodeficiência grave (contagem de LTCD4+ abaixo de 200 céls/mm^3), até que um grau satisfatório de reconstituição imune seja obtido. A vacinação utilizando organismos atenuados deve ser especialmente considerada, tendo em vista que em pacientes imunossuprimidos existe risco destas vacinas provocarem infecções incontroláveis.

B) Parâmetros imunológicos para imunizações com vacinas de bactérias ou vírus vivos em pacientes maiores de 13 anos infectados pelo HIV

Contagem de LT-CD4+ (percentual)	Recomendação para uso de vacinas com agentes vivos atenuados
>350 céls/mm^3 (>20%)	Indicar o uso
200-350 céls/mm^3 (15%-19%)	Avaliar parâmetros clínicos e risco epidemiológico para a tomada de decisão
<200 céls/mm^3 (<15%)	Não vacinar

Fonte: DIAHV/SVS/MS.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018. 412 p. : il. ISBN 978-85-334-2640-5

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

A profilaxia contra infecções oportunistas tem como objetivo reduzir a possibilidade de infecções e consequentemente diminuir morbimortalidade. A contagem de LTCD4+ é o principal parâmentro utilizado para indicar início e suspenção do tratamento. A profilaxia pode ser dividida em primária, cujo objetivo é evitar o primeiro episódio de doença, e secundária, cujo objetivo é pevinir a recorrência.

C) Profilaxia primária das infecções oportunistas

AGENTE	INDICAÇÃO	1ª ESCOLHA	ALTERNATIVAS	CRITÉRIOS DE SUSPENSÃO
Pneumocystis jiroveci	**LT-CD4+ <200 céls/mm³** (ou <14%) ou presença de candidíase oral ou febre indeterminada com mais de duas semanas de duração ou doença definidora de aids	SMX-TMP (800/160mg) 3x/semana	Dapsona 100mg/dia	Boa resposta à TARV com **manutenção de LT-CD4+ >200 céls/mm³ por mais de 3 meses** Reintroduzir profilaxia se LT-CD4+ <200 céls/mm³
Toxoplasma gondii	LT-CD4+ <100 céls/mm³ e IgG anti T. gondii reagente	SMX-TMP (800/160mg) 1x/dia	Dapsona 50mg/dia + pirimetamina 50mg/semana + ácido folínico 10mg 3x/semana ou clindamicina 600mg 3x/dia + pirimetamina 25-50mg/dia + ácido folínico 10mg 3x/semana	Boa resposta à TARV com **manutenção de LT-CD4+ >200 céls/mm³ por mais de 3 meses** Reintroduzir profilaxia se LT-CD4+ <100 céls/mm³
***Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose latente)**	PT >5mm ou história de contato com paciente bacilífero ou Rx de tórax com cicatriz de TB sem tratamento prévio	Isoniazida 5mg/kg/dia (dose máx. 300mg/dia) – a associação com piridoxina 50mg/dia pode reduzir o risco de neuropatia ou rifampicina na dose de 10 mg/kg (dose máxima de 600 mg/dia)		Duração de 6-9 meses para isoniazida (preferencialmente a utilização de 270 doses em 9-12 meses) ou 4 meses para rifampicina
Complexo *Mycobacterium avium*	LT-CD4+ <50 céls/mm³	Azitromicina 1.200-1.500mg/semana	Claritromicina 500mg 2x/dia	Boa resposta à TARV com **manutenção de LT-CD4+ >100 céls/mm³ por mais de 3 meses** Reintroduzir profilaxia se LT-CD4+ <50céls/mm³
Cryptococcus sp.	Não se indica profilaxia primária para criptococose e histoplasmose			
Histoplasma capsulatum	Evitar situações de risco, tais como entrar em cavernas ou se expor a fezes de pássaros e morcegos			
Citomegalovirus	Não se indica profilaxia primária Recomenda-se diagnóstico precoce de retinopatia por meio de fundoscopia rotineira em PVHIV com LT-CD4+ <50 céls/mm³			
Herpes simplex	Não se indica profilaxia primária			

Fonte: DIAHV/SVS/MS.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018. 412 p. : il. ISBN 978-85-334-2640-5

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

D) Profilaxia secundária das infecções oportunistas

AGENTE	1ª ESCOLHA	ALTERNATIVAS	CRITÉRIO DE SUSPENSÃO
Pneumocystis jiroveci	SMX-TMP (800/160mg) 3x/semana	Dapsona 100mg/dia	Boa resposta à TARV com **manutenção de LT-CD4+ >200 céls/mm³ por mais de 3 meses**
Toxoplasma gondii	**Peso <60kg:** Sulfadiazina 500mg 4x/dia + pirimetamina 25mg 1x/dia + ácido folínico 10mg 1x/dia **Peso >60kg:** Sulfadiazina 1.000mg 4x/dia + pirimetamina 50mg 1x/dia + ácido folínico 10mg 1x/dia	SMX-TMP (800/160mg) 2x/dia ou clindamicina 600mg 3x/dia + pirimetamina 25-50mg 1x/dia + ácido folínico 10mg 1x/dia (acrescentar cobertura profilática para PCP)	Boa resposta à TARV com **manutenção de LT-CD4+ >200 céls/mm³ por mais de 6 meses**
Complexo Mycobacterium avium	Claritromicina 500mg 2x/dia + etambutol 15mg/kg/dia (máx. 1.200mg/dia)	Azitromicina 500mg 1x/dia + etambutol 15mg/kg/dia (máx. 1.200mg/dia)	**Após um ano de tratamento para MAC, na ausência de sintomas e LT-CD4+ >100 céls/mm³ por mais de 6 meses** Reintroduzir se LT-CD4+ <100 céls/mm³
Cryptococcus sp.	Fluconazol 200mg 1x/dia	Itraconazol 200mg 2x/dia ou anfotericina B desoxicolato 1mg/kg 1x/semana	**Término do tratamento de indução e consolidação e pelo menos 1 ano de manutenção, assintomático e LT-CD4+ >200 céls/mm³ por mais de 6 meses**
Isospora belli	SMX-TMP (800/160mg) 3x/semana	Pirimetamina 25mg 1x/dia + ácido folínico 10mg 3x/semana	Não há recomendação específica. No entanto, indica-se a suspensão da profilaxia com LT-CD4+ **>200 céls/mm³ por mais de 3 meses**
Citomegalovírus (apenas para retinite, não indicada rotineiramente para doença gastrointestinal)	Ganciclovir EV 5mg/kg/dia 5x/semana	Foscarnet 90-120mg/kg 1x/dia	Boa resposta à TARV com manutenção de LT-CD4+ >100 céls/mm³ por mais de 3-6 meses
Histoplasmose (doença disseminada ou infecção do SNC)	**Itraconazol 200mg 1x/dia**		Manutenção por tempo indeterminado, pois não há evidência suficiente para a recomendação de interrupção do itraconazol **Considerar suspensão após período mínimo de um ano de tratamento de manutenção, ausência de sintomas e LT-CD4+ >150 céls/mm³ por mais de 6 meses** Reintroduzir se LT-CD4+ <150 céls/mm³
Herpes simplex **Infecção recorrente (>6 episódios/ano)**	Aciclovir 400mg 2x/dia		
Candidíase esofágica	Não se indica a profilaxia secundária para candidíase esofágica		

Fonte: DIAHV/SVS/MS.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018. 412 p. : il. ISBN 978-85-334-2640-5

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

EXERCÍCIOS 2

1. Quais são as células que o HIV infecta?

_____

_____

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

_____

_____

_____

_____

_____

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

_____

_____

_____

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 antiretroviral 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 (0,5 a 50 micrômetros no FACSVia), 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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

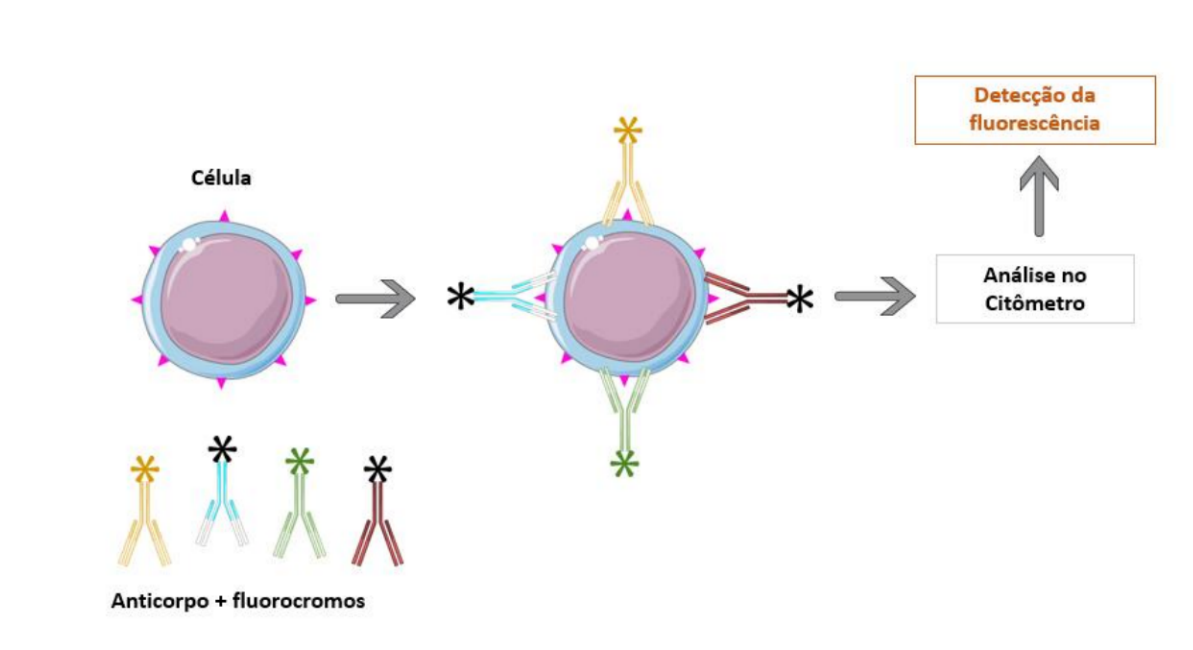


Figura 15: Imunofenotipagem. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

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 exempo, 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 nm.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

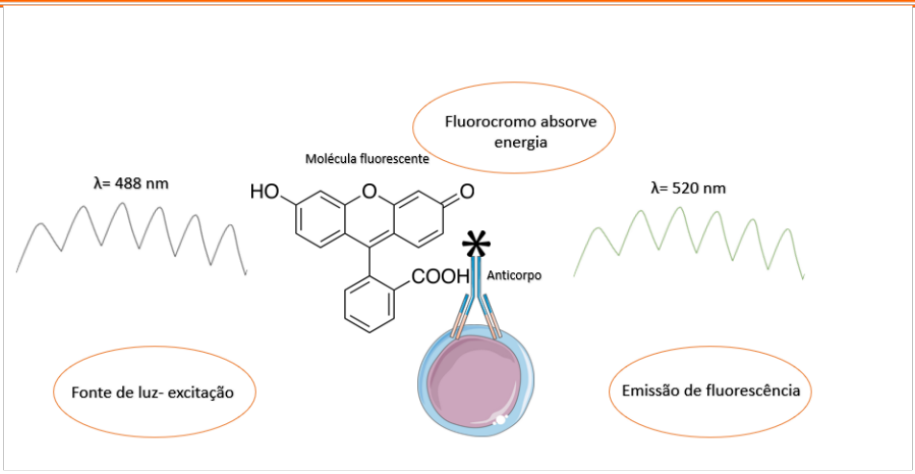


Figura 16: Emissão de fluorescência. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

Na rotina de quantificação de CD4/CD8 utilizamos um reagente denominado MultiTEST 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.

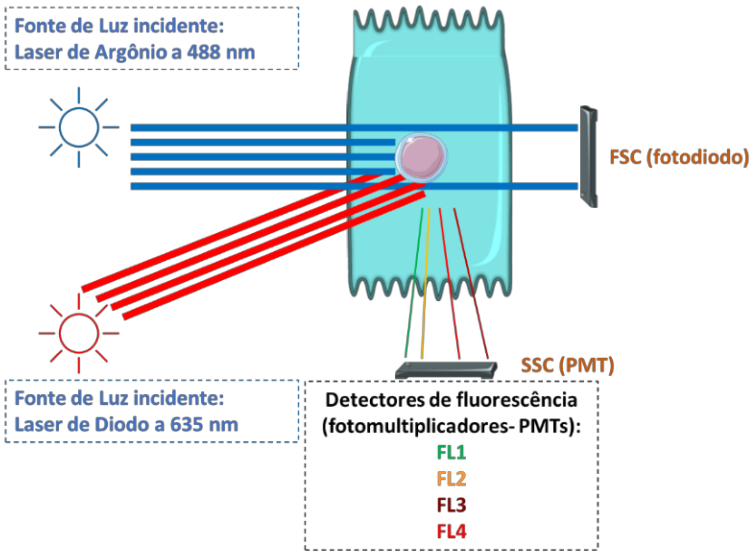


Figura 17: Princípio básico da citometria de fluxo. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

O fotodetector FL1 (Fluorescência 1) capta luz de comprimento de onda de 518 a 548 nm, que corresponde à luz verde. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente MultiTEST é o FITC. No reagente MultiTEST, 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 565 a 605 nm, o que corresponde à luz laranja. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente MultiTEST é o PE. No reagente MultiTEST, 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 MultiTEST é o PerCP. No reagente MultiTEST, 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 663 a 687 nm, o que corresponde à luz vermelha. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente MultiTEST é o APC. No reagente MultiTEST, 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 MultiTEST:

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

Tabela 1: Combinação anticorpos/fluorocromos/fotodetector – reagente MultiTEST

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

interceptadas pelo feixe de laser. Esse transporte é feito de forma alinhada, para que cada célula/partícula seja individualmente analisada.

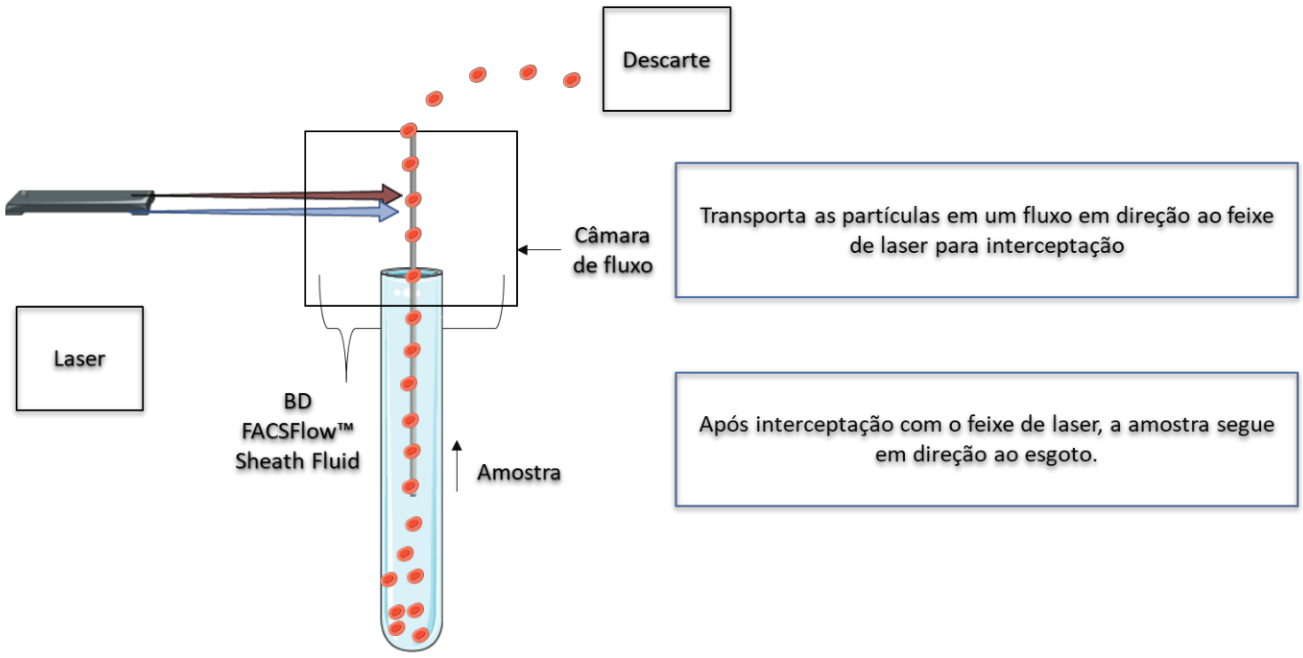


Figura 18: Sistema Fluídico. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

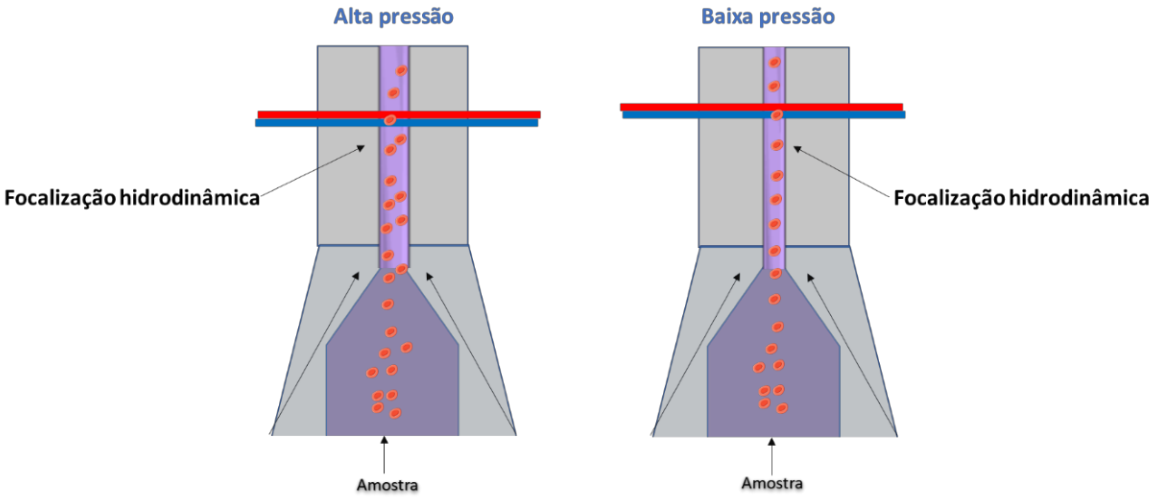


Figura 19: Vazão de amostra. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art https://smart.servier.com/.

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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Detector	Filtro	Fluorocromo	Pico de Emissão	Cor da Emissão	Excitação	Marcador
FL1	BP 533/30 nm	FITC	520nm	Verde	laser azul	CD3
FL2	BP 585/40 nm	PE	575nm	Laranja	laser azul	CD8
FL3	670 nm LP	PerCP	675nm	Vinho	laser azul	CD45
FL4	BP 675/25 nm	APC	660nm	Vermelho	laser vermelho	CD4

Tabela 2: Sistema Óptico

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 FACSVia, 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*).

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

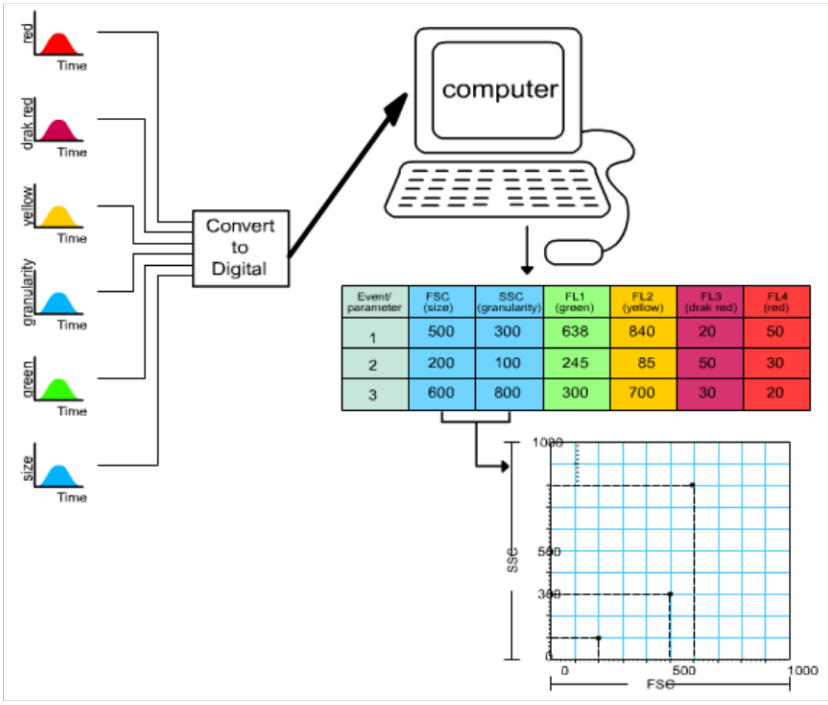


Figura 20: Sistema Eletrônico.

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.

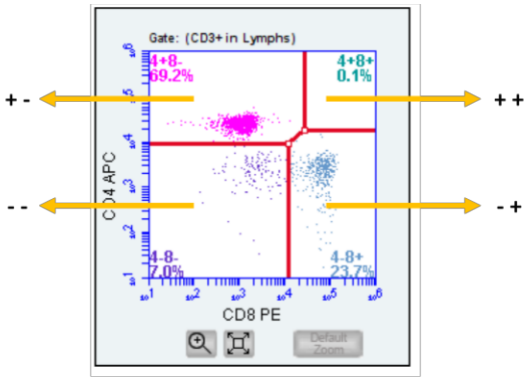
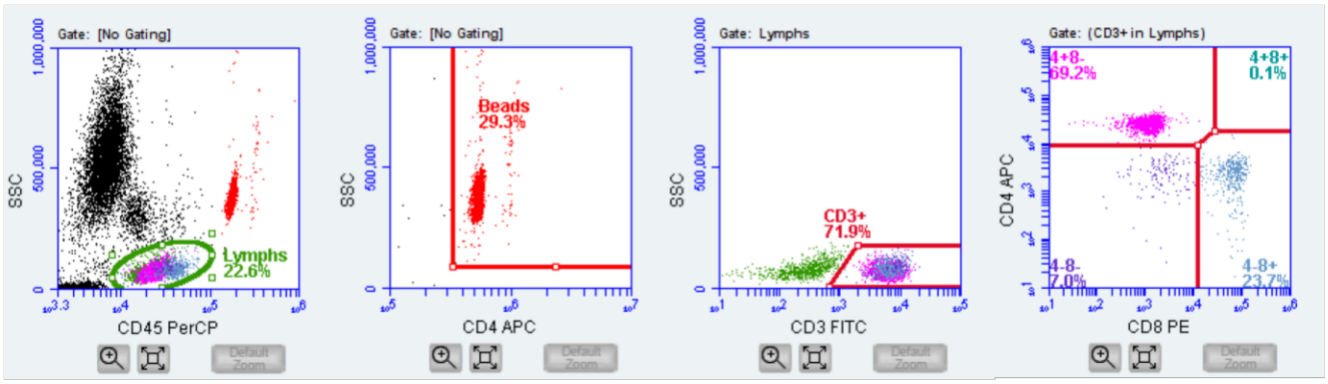


Figura 21: Como interpretar um dot plot.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

VISUALIZAÇÃO DOS DADOS NO BD FACSVia CLINICAL SOFTWARE

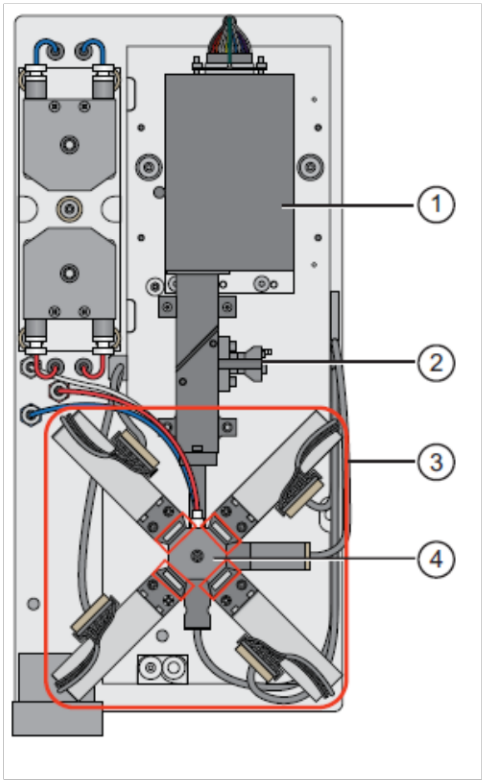


Nessa seção foram utilizadas as referências 8 -18 descritas no capítulo final desse documento. *As informações contidas nessa seção também podem ser encontradas no capítulo 1 Introdução do manual do usuário.*

APRESENTAÇÃO DO EQUIPAMENTO

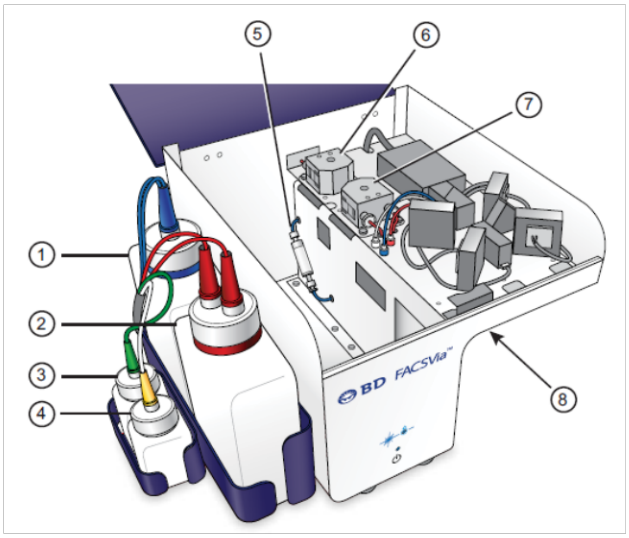
Nº	Item	Descrição
1	Indicador de evento	Pisca conforme os eventos passam na frente do laser. Quanto maior a taxa de eventos, mais rápido ele piscará.
2	Indicador de energia	Acende em azul sólido para indicar que o citômetro está ligado e pronto para uso. Pisca durante a inicialização e o desligamento.
3	Botão liga/ desliga	Usado para ligar e desligar o citômetro.
4	SIP	Sonda de injeção de amostras (*Sample Injection Probe)*. Usada para aspirar a amostra do tubo de amostra para a célula de fluxo.
5	Base da amostra	Usado para fixar o tubo de amostra no lugar.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.



Nº	Componente	Descrição
1	Laser azul	488 nm
2	Laser vermelho	640 nm
3	Conjunto óptico (quatro filtros são realçados)	FL1 533/30 nm FL2 585/40 nm FL3 >670 nm FL4 675/25 nm
4	Célula de fluxo (no centro de quatro filtros)	Capilar onde o laser intercepta o fluxo de amostra

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.



Nº	Componente	Descrição
1	Tanque de solução de sheath (azul)	Tanque de 2 l para água deionizada (DI) filtrada em filtro de 0,2 µm com Sheath Additive
2	Tanque de descarte (vermelho)	Tanque de 2 l para coletar descartes
3	Tanque de solução detergente (verde)	Tanque de 250 ml para solução detergente
4	Tanque BD FACSClean (amarelo)	Tanque de 250 ml para solução BD™ FACSClean
5	Filtro em linha de solução de sheath	Filtro em linha para filtrar a solução de sheath.
6	Bomba de solução de Sheath	A bomba peristáltica que move a solução de Sheath do tanque de solução de Sheath pelo sistema.
7	Bomba de descarte	A bomba peristáltica que move o fluido para o tanque de descarte.
8	SIP	Sonda de injeção de amostras. Aspira a amostra do tubo de amostra para a célula de fluxo.

As informações apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 2: About the system

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

PREPARO DAS SOLUÇÕES E INICIALIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO

1. Com o citômetro desligado realize o preparo das soluções necessárias para o funcionamento do equipamento.

Tanque	Regente	Modo de preparo
Tanque de solução de sheath (azul)	BD Sheath Additive (cada caixa contém: 10 garrafas de 5 mL cada)	Adicione uma garrafa (5 mL) de BD Sheath Additive em 1 litro de água destilada.
Tanque de solução detergente (verde)	BD Detergent Solution Concentrate (garrafa de 15 mL)	Adicione 3 mL de BD Detergent Solution Concentrate em 197 mL de água destilada.
Tanque de solução BD FACSClean (amarelo)	BD FACSClean Solution (galão de 5 L)	Solução pronta para uso. Adicione 200 mL da solução.
Tanque de descarte (vermelho)	Hipoclorito 5% a 2,5%	Esfazie o conteúdo.Adicione volume necessário de hipoclorito para que quando o tanque estiver cheio, a concentração de hipoclorito esteja entre 0,5% a 1%.

2. Certifique-se de que um tubo com pelo menos 2 ml de água DI esteja carregado na SIP. Se necessário:
    a. Empurre a base da amostra para trás.
    b. Coloque o tubo de água sobre a SIP.
    c. Enquanto segura o tubo, empurre a base da amostra para frente para sustentá-lo.

3. Ligue o citômetro BD FACSVia com um clique no Botão liga/ desliga na parte frontal do equipamento.
4. Ligue o computador e abra o FACSVia Clinical Software.
5. Após o ligamento, o BD FACSVia comecará automaticamente o processo de inicialização e a passagem das soluções pelo sistem fluídico. Durante este processo o semáforo apresentará a cor amarela.

    a. O processo de inicialização leva em torno de 15 min, no entanto pode levar aproximadamente 25 min durante a inicialização extendida que ocorre quando o citômetro é desligado de forma inadequada.
    b. Após a inicialização o semáforo apresentará a cor verde, indicando que está conectado e pronto.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

6. Realize o processo de SIP Clean (Limpeza da SIP) na guia Acquire (Aquisição).
    a. Uma caixa de diálogo será aberta solicitando que você coloque um tubo contendo 2 mL de BD FACSClean que será lido por 5 min. Após será solicitado trocar o tubo com BD FACSClean por um contendo 2 mL de água destilada que também será lido por 5 min.

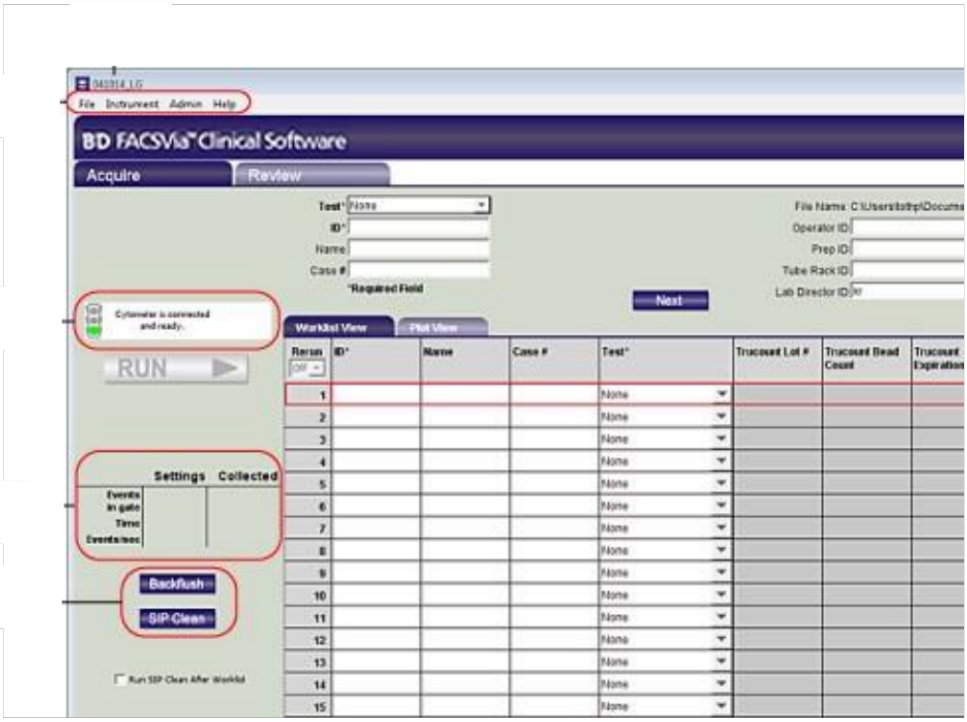


Figura 23: Interface do BD FACSVia Clinical Software

Ao final deste processo, o citometro está pronto para a realização do controle de qualidade.

As informações apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 3: Startup and shutdown

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

EXERCÍCIOS 3

1. Quais propriedades da célula ou partícula podem ser medidas pelo citômetro de fluxo?

_____

_____

2. Quais são os três sistemas que compõem o citômetro de fluxo e qual é a função de cada um deles?

_____

_____

_____

3. FSC é proporcional ao _____ da célula.

4. SSC é proporcional a _____ ou à _____ da célula.

5. Seguindo a frase abaixo, una as colunas:

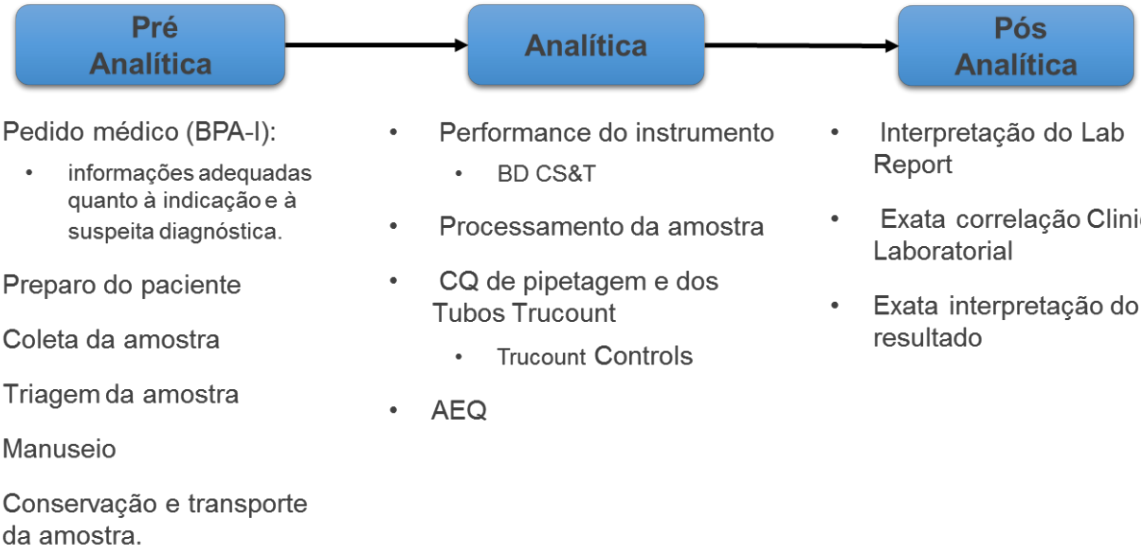
No reagente Multitest, o anticorpo anti- (COLUNA 1) é conjugado ao fluorocromo (COLUNA 2). Ao ser excitado pelo laser (COLUNA 3), o fluorocromo emite uma luz de cor (COLUNA 4) que é lida no detector (COLUNA 5).

COLUNA 1	COLUNA 2	COLUNA 3	COLUNA 4	COLUNA5
CD3	_____	_____	_____	_____
CD4	_____	_____	_____	_____
CD8	_____	_____	_____	_____
CD45	_____	_____	_____	_____

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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:



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 coleta em tubos EDTA K_2 ou K_3 , 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 MultiTEST 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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

também sejam observadas (lipemia, 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 hemáceas, o resultado dessa lise é a liberação de uma série de moléculas pró inflamatórias que acabam por influenciar a sobrevida 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 ± 0,5 mg/mL de sangue). Amostras que chegarem ao laboratório fora do intervalo de temperatura aceitável, mas que não apresentarem características físicas de hemólise podem ser processadas porém, no laudo de liberação do resultado da amostra deve estar contido 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 ictéricas 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 amostra seja processada e, em caso de resultado aberrante, que seja realizado o protocolo de substituição do volume plasmático (ver soluções e problemas nas amostras e controles).

- **Conservação e transporte da amostra:** a amostra *in natura* deve ser armazenada em temperatura ambiente (20°C a 25°C) até o seu processamento. Depois de processada a amostra deve ser armazenada em temperatura ambiente 20°C a 25°C sob o 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 superidores 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 recipente 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 quente.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

FASE ANALÍTICA

Nessa fase, daremos foco as etapas: **Controle de qualidade instrumental, Processamento da amostra, Controle de qualidade de pipetagem e tubos Trucount.**

Controle de qualidade instrumental/Calibração

A calibração do instrumento constitui uma das principais etapas do trabalho com citomotria 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 FACSVia, utiliza-se o reagente BD CS&T.

O BD CS&T é composto de uma suspensão de esferas (beads) com tamanho e intensidade de fluorescência estáveis e uniformes. Ele apresenta quantidades idênticas de esferas de poliestireno de 3 µm (fortes), 3 µm (médias) e 2 µm (fracas). A dispersão frontal (FSC) e a dispersão lateral (SSC) identificam populações de esferas com base no tamanho relativo. Após a identificação das esferas, a intensidade de fluorescência é medida pelos detectores do citômetro, processada eletronicamente e apresentada e analisada pelo software. O BD CS&T permite ao software medir o desempenho e a sensibilidade de cada detector. A sensibilidade é uma medida da capacidade de resolução do citômetro para células com fraca marcação. Adicionalmente, as esferas são utilizadas para otimizar as definições de compensação sempre que o CQ do equipamento é executado. Assim, o BD CS&T atua como controle de qualidade e calibrador do equipamento e deve ser utilizado todos os dias em que a rotina for executada.

Preparo do BD CS&T

O BD CS&T é fornecido em uma caixa contendo dois ou seis frascos de 3 ml cada, sendo suficientes para 50 e 150 testes respectivamente. O preparo do BD CS&T é feito em um único tubo e o frasco das beads deve ser muito bem homogeneizado antes de ser adicionado ao tubo.

Para preparar as BD CS&T Beads para a aquisição:

1. Separe e identifique um tubo de citometria
2. Homogeneíze o frasco de BD CS&T, invertendo-o vigorosamente 10 vezes ou agitando-o em um vórtex à velocidade média durante 5–10 segundos.
3. No tubo de citometria, pipete 500µL de água destilada e pingue 2 gotas de BD CS&T.
4. Homogeneíze o tubo num vórtex antes da utilização.
5. Faça a leitura no software do equipamento.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

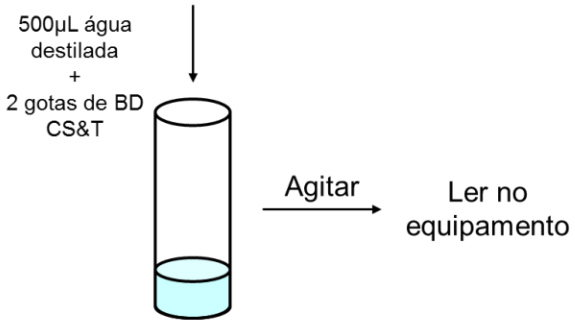
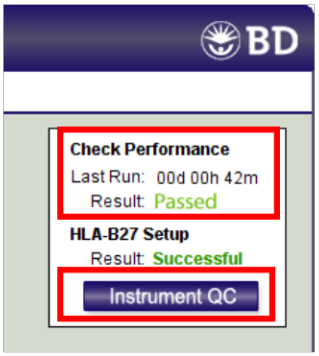


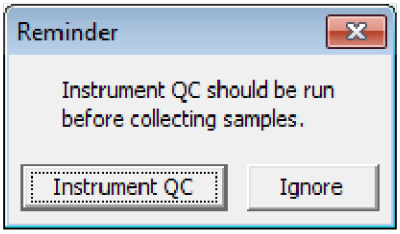
Figura 24: Preparo do BD CS&T.

A BD recomenda que a calibração seja feita imediatamente após o preparo do BD CS&T, porém, caso isto não seja possível, o reagente deve ser mantido sob proteção da luz e armazado por até oito horas na geladeira (4°C a 8°C).

Procedimentos para Calibração:

1. Abra o BD FACSVia Clinical Software.
2. O resultado atual do CQ e o tempo decorrido desde que o teste foi realizado são mostrados no canto superior direito da guia Acquire (Aquisição).
    a. Se o último teste de CQ falhou ou foi realizado há mais de 24 horas, uma caixa de diálogo é aberta assim que você entra no software para solicitar a realização do CQ. Essa caixa de diálogo é exibida antes de cada amostra que será processada.



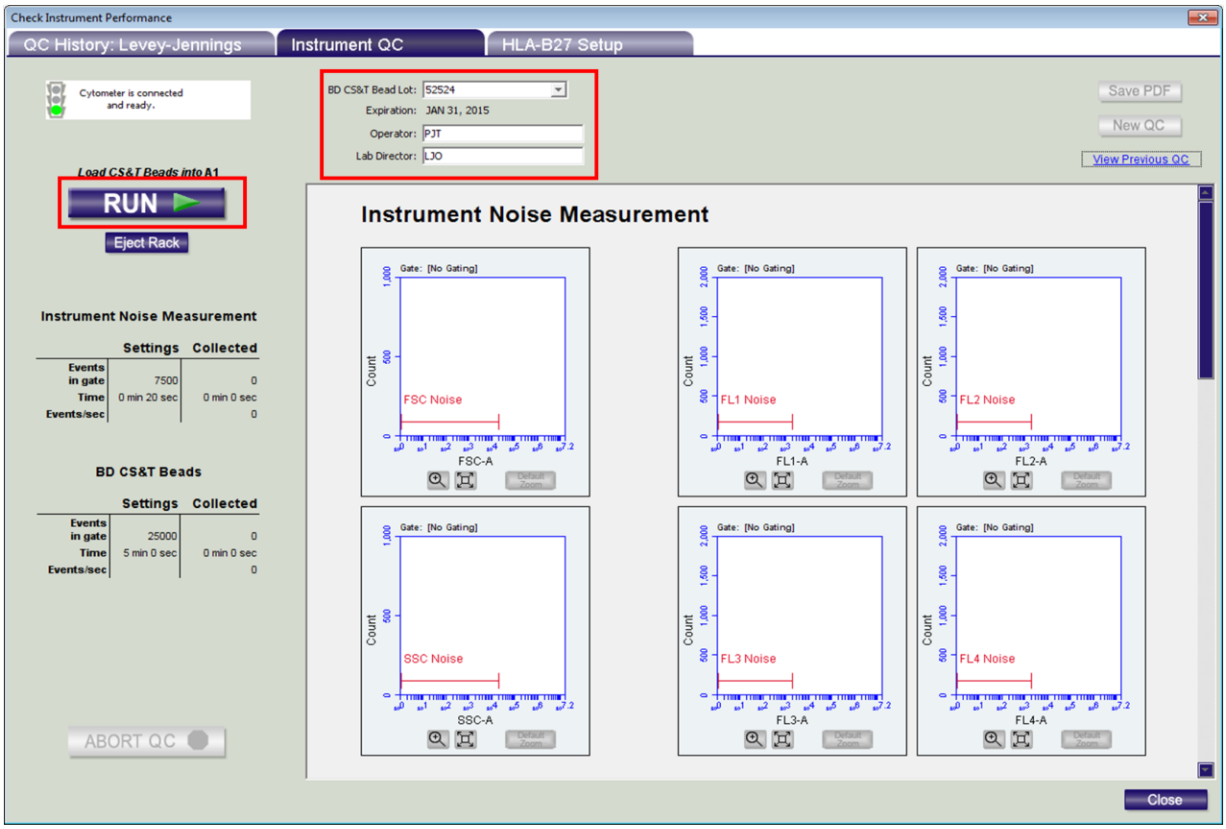


3. Clique em Instrument QC (CQ do instrumento) no canto superior direito do espaço de trabalho. O módulo de CQ é aberto.
4. Selecione o lote de esferas no menu BD CS&T Bead Lot (Lote de BD CS&T Beads).

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

a. O lote de esferas a ser utilizado é o número de lote impresso no tubo, não na caixa. Veja a seguir, caso você precise instalar um novo lote.

5. Insira seu ID de operador e o ID do diretor do laboratório.
6. Execute as CS&T Beads, clicando em “Run”



7. Aguarde a conclusão da aquisição.
8. Quando a aquisição estiver concluída, a tabela QC Report (Relatório de CQ) é exibida e os resultados são mostrados na parte superior da tela.
9. Após a aquisição, coloque um tubo com água destilada na SIP.

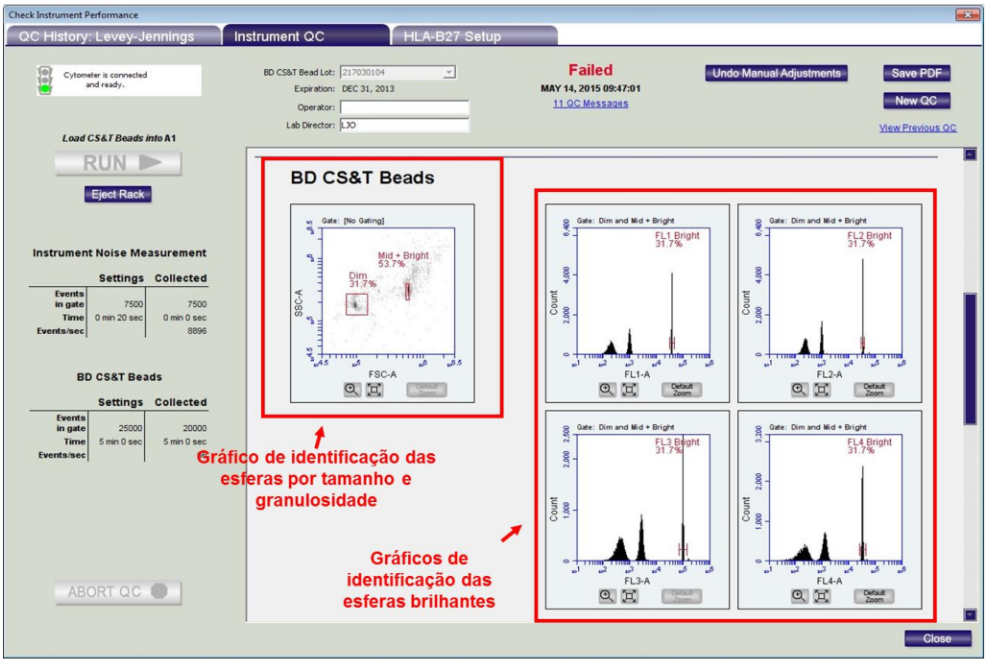
© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Ajustando as regiões

Após a conclusão da aquisição de esferas, e enquanto os resultados de CQ são exibidos, você deve ajustar as regiões definidas pelo software para a análise das esferas de alto brilho. Isso se deve porque o software define a região para as esferas de alto brilho com base em valores-alvo, e não nos locais reais das populações. Assim, você deverá verificar e otimizar essas regiões.

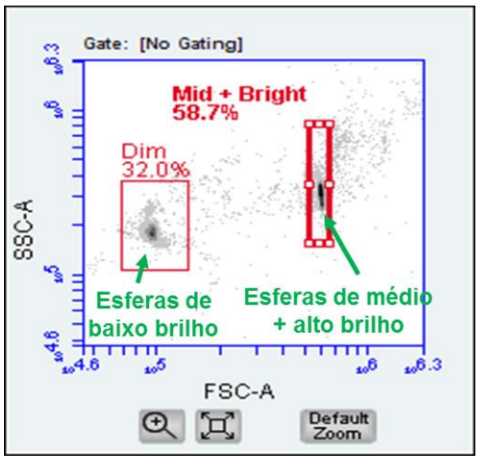
Observação: Não ajuste as regiões para os picos de ruído (Instrument Noise Measuremet), somente a parte do relatório entitulada BD CS&T Beads deve ser otimizada.

1. No gráfico de identificação das esferas por tamanho e granulosidade, use a ferramenta de zoom para aproximar os dados de esferas antes de ajustar as regiões.
2. Ajuste a região para as esferas de baixo brilho (Dim) e a região para as esferas de médio+alto brilho (Bright). Exclua a população de doublets à direita das esferas de médio+ alto brilho.
    a. Posicione o cursor sobre uma alça. Uma seta apontando para dois lados é mostrada. Clique e arraste para ajustar a região em qualquer direção. Quando você ajusta uma alça do canto, a região muda automaticamente para um retângulo.
    b. Coloque o cursor sobre uma área diferente de uma alça. Uma seta apontando para quatro lados é mostrada. Clique e arraste para mover a região inteira em qualquer direção.

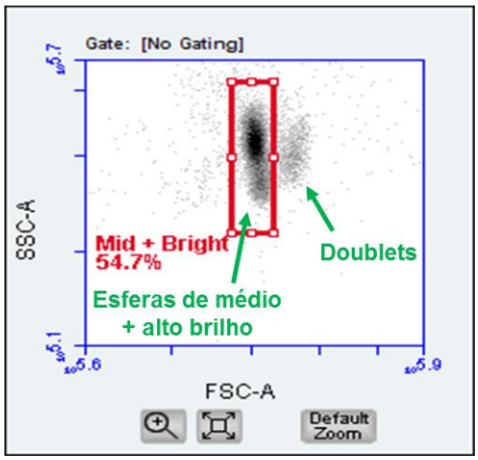


© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Sem Zoom

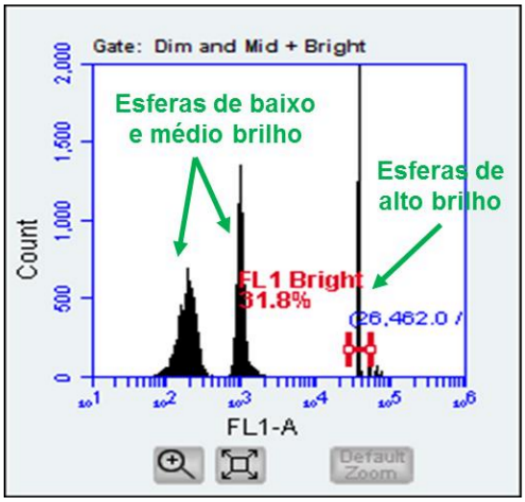


Com Zoom

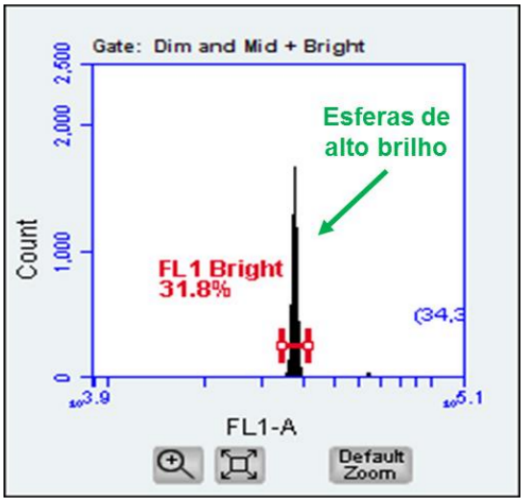


3. Após ajustar o gate de identificação das eferas em tamanho e granulosidade é necessário ajustar o gate referente as beads de alto brilho para cada um dos detectores (FL-1, FL-2, FL-3 e FL-4) .
4. Use a ferramenta de zoom para aproximar as populações de esferas antes de ajustar os markers.
5. Clique no marker de esferas de alto brilho para selecioná-lo.
6. Ajuste os gates.
    a. Coloque o cursor sobre uma alça para arrastá-la para a esquerda ou para a direita.
    b. Coloque o cursor sobre a linha horizontal entre as alças para mover o gate inteiro em qualquer direção.

Sem Zoom



Com Zoom



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Interpretação do QC Report

Após o ajuste dos gates os valores do QC Report são automaticamente calculados e apresetados como abaixo. Se qualquer um dos resultados para um parâmetro individual for reprovado, o resultado do parâmetro reprovado será mostrado em vermelho e uma mensagem de falha (fail) em vermelho aparecerá na parte superior .

Results

QC Report

Parameter	Bright Bead Median	MFI Range		% Bright Bead rCV	Instrument Sensitivity	Sensitivity Spec.	Parameter Pass/Fail
FSC	586853	477453	716179	2.5%	127	30	Pass
SSC	308774	240276	360414	11.3%	104	50	Pass
FL1	34828	27688	41532	2.8%	232	80	Pass
FL2	33543	26889	40334	3.3%	647	200	Pass
FL3	89522	68504	102755	3.3%	90	40	Pass
FL4	28973	24718	37077	5.4%	155	70	Pass

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

1. Todos os valores de Mediana das Esferas de Alto Brilho (Bright Bead Median) para FSC, SSC, FL-1, FL-2, FL-3 e FL-4 **DEVEM estar dentro do Intervalo de MFI (MFI Range)**;
2. Os valores de rCV % das esferas de alto brilho (% Bright Bead rCV) para FL-1, FL-2, FL-3 e FL-4 **DEVEM ser *menores que 6%***;
3. A Sensibilidade do Instrumento (Instrument Sensitivity) para todos os parametros ***DEVE ser igual ou maior que a Especificação de sensibilidade (Sensitivity Spec.) ;***

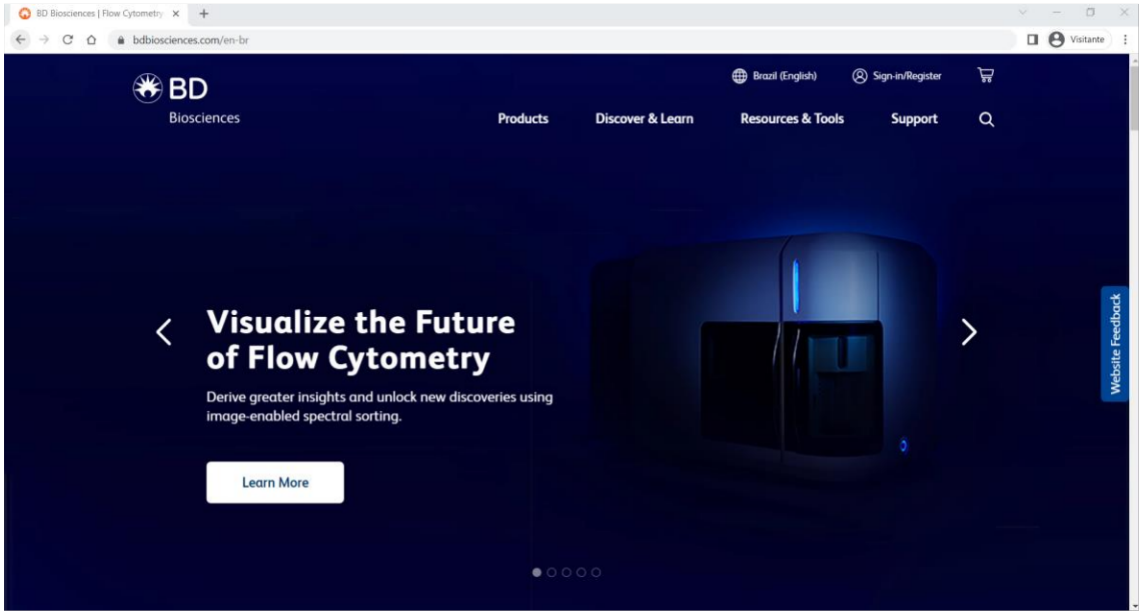
Se todos os pontos do BD CS&T estiverem de acordo com as recomendações acima, a mensagem “Passou” (Passed) em verde aparecerá na parte superior da janela. O equipamento estará então pronto para uso e a janela de controle de qualidade poderá ser então fechada, clicando-se no botão “Close” no lado direito infeiror. Um arquivo pdf com o relatório será gerado e automaticamenete salvo.

Instalação de um novo lote de esferas

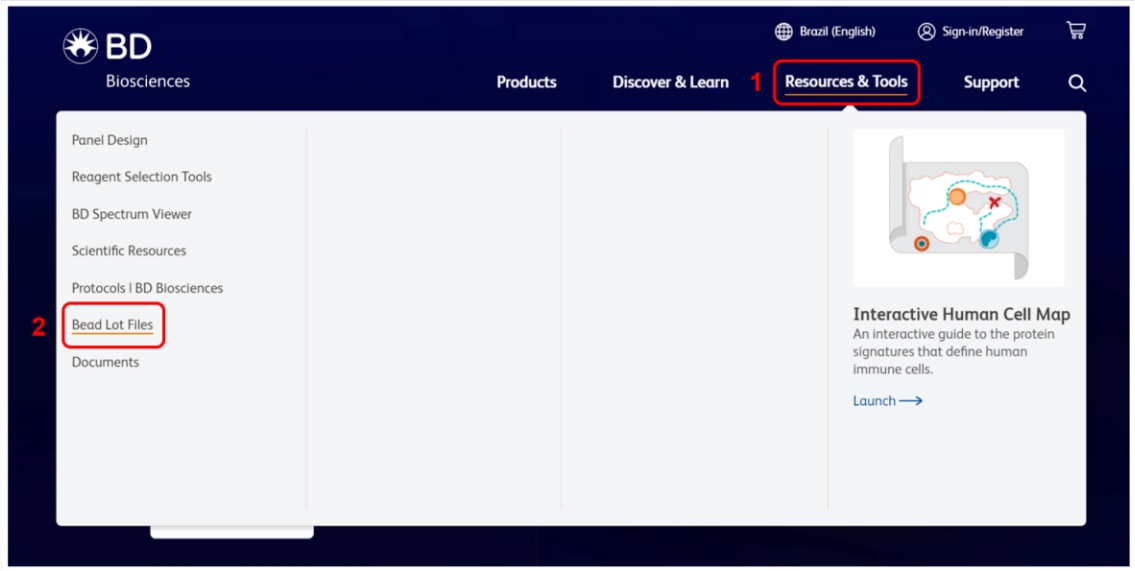
Se esta for a primeira vez em que você está processando um lote de esferas, será necessário instalar o arquivo do lote de BD CS&T. O arquivo do lote de esferas contém informações específicas do lote de esferas, como data de validade, rCV, MFIs alvo e especificações de sensibilidade.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

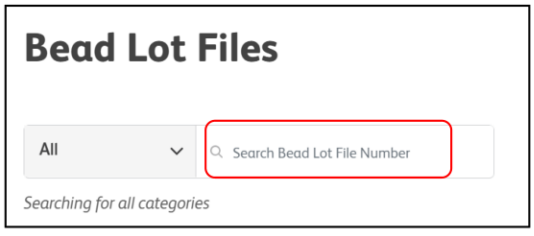
1. Em um computador com acesso a internet, acesse o site www.bdbiosciences.com/br



2. Selecione a guia **Resources & Tools > Bead Lot Files**



3. Digitar o lote <u>presente no frasco</u> (e não na caixa) do CS&T no campo de busca.



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

4. Baixe o arquivo de lote necessário.
5. Transporte o arquivo de lote para o computador conectado ao BD FACSVia e coloque-o no local desejado.
6. Abra o BD FACSVia Clinical Software.
7. Clique em Instrument QC no lado superior direito.
8. Selecione a opção **Install** (Instalar) no menu **BD CS&T Bead Lot** (Lote de BD CS&T Beads).
9. Uma caixa de diálogo se abrirá. Nela, selecione a opção **Install New Bead Lot** (Instalar novo lote de esferas) e aperte em **Choose file**. Localize o arquivo de lote de esferas que você baixou em seu computador e clique em **Open** (Abrir).

Uma vez instalado, o número do lote de esferas estará disponível para seleção no menu BD CS&T Bead Lot (Lote de BD CS&T Beads) para as execuções subsequentes de CQ.

As informações apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 4: Quality control

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

EXERCÍCIOS 4

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

_____

_____

_____

2. Quando devemos realizar a calibração do FACSVia?

_____

_____

3. O que deve ser observado no QC Report? Responda detalhadamente.

_____

_____

_____

_____

_____

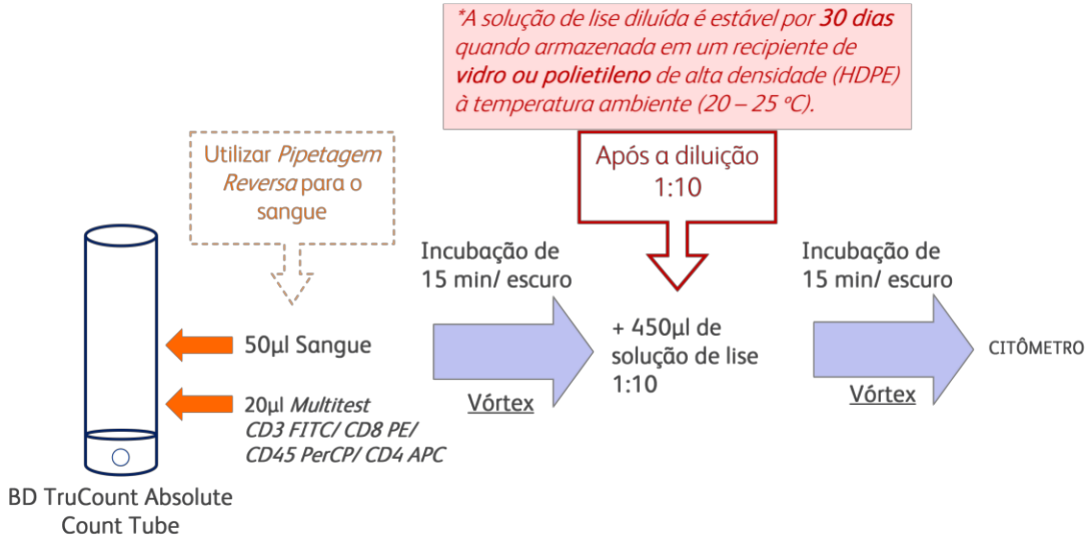
© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 K_2 ou K_3. Após a coleta, o sangue deve ser utilizado para a preparo da amostra em até 48 horas, desde que este sangue tenha sido mantido em temperatura ambiente (20 °C a 25 °C) e sem agitação. O protocolo que deve ser utilizado no preparo das amostras é o que foi preconizado pelo fabricante do reagente utilizado para a marcação das células (MultiTEST).

Figura 25: Preparo de amostra.



Preparo das amostras

Etapa 1- Adicionar o reagente Multitest aos tubos TruCOUNT™.

As amostras para quantificação de CD4/CD8 são processadas em tubos denominados tubos BD TruCOUNT™. 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 MultiTEST™ dentro dos tubos, é muito importante verificar a integridade do *pellet* de beads. O MultiTEST™ 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 MultiTEST™ deve ser pipetado (20µL) nos

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

tubos BD TruCOUNT™ com cuidado para que a ponteira não toque no *pellet* de beads. Quando o reagente toca as beads, elas são solubilizadas.

Etapa 2- Pipetar o sangue.

O volume de sangue utlilizado 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.

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

Após os 15 minutos de incubação 450μL da solução de lise (FACSLysing 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 recipiente de vidro ou polietileno de alta densidade (HDPE). Depois deste procedimento, o tubo deve ser homegeneizado e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C) sob o abrigo da luz.

Etapa 4- Leitura no BD FACSVia.

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).**

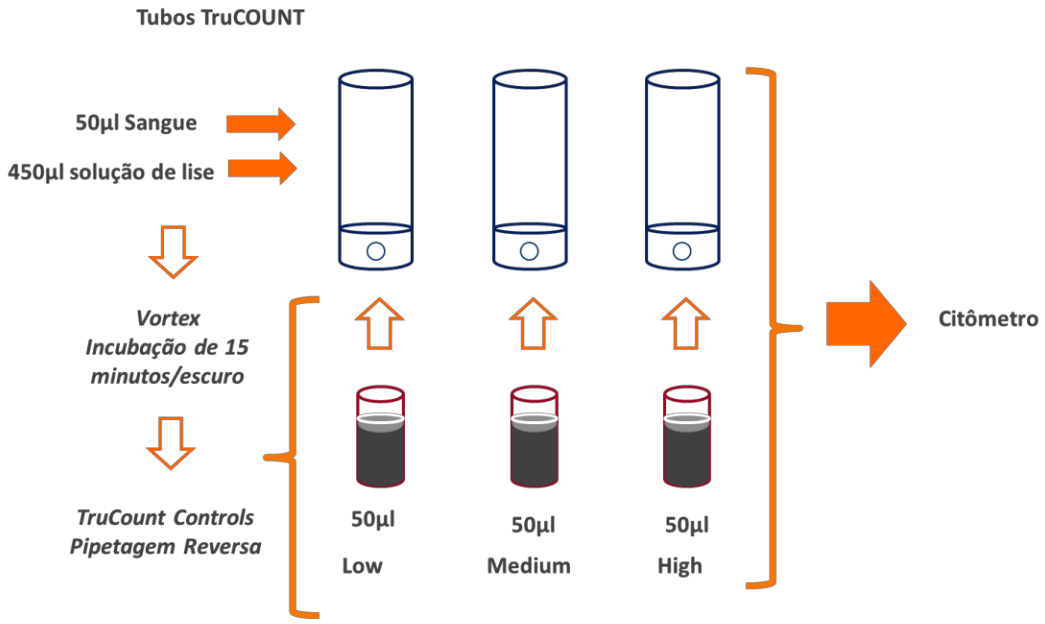
Preparo dos Controles

Os controles BD TruCOUNT (BD TruCOUNT Controls) monitoram o funcionamento correto dos tubos TruCOUNT 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 50□L 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). Os controles podem ser preparados com sangue de pacientes saudáveis ou pacientes HIV positivos que atenderem aos pré-requisitos de uma amostra em boa qualidade.

No preparo dos controles adicionamos 50μL de sangue periférico em 3 tubos distintos (low, medium e high) seguidos da adição de 450 μL de solução de lise (BD FACSLysing diluída 1:10 em água destilada). Depois deste procedimento, o tubo deve ser homegeneizado e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C) sob o abrigo da luz. Após os 15 minutos de incubação, 50 μL de cada bead dos controles BD TruCOUNT devem ser adicionados em seu tubo correspondente (pipetagem reversa). Assim teremos um tubo para o controle

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

alto, um tubo para o controle médio e um tubo para o controle baixo. Antes da pipetagem, os frascos dos TruCOUNT Controls devem ser vortexados gentilmente por 30 segundos. Após, a adição dos controles aos tubos, os mesmos já podem ser adquiridos no citômetro



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.

BD FACSVia SOFTWARE e Aquisição de amostras

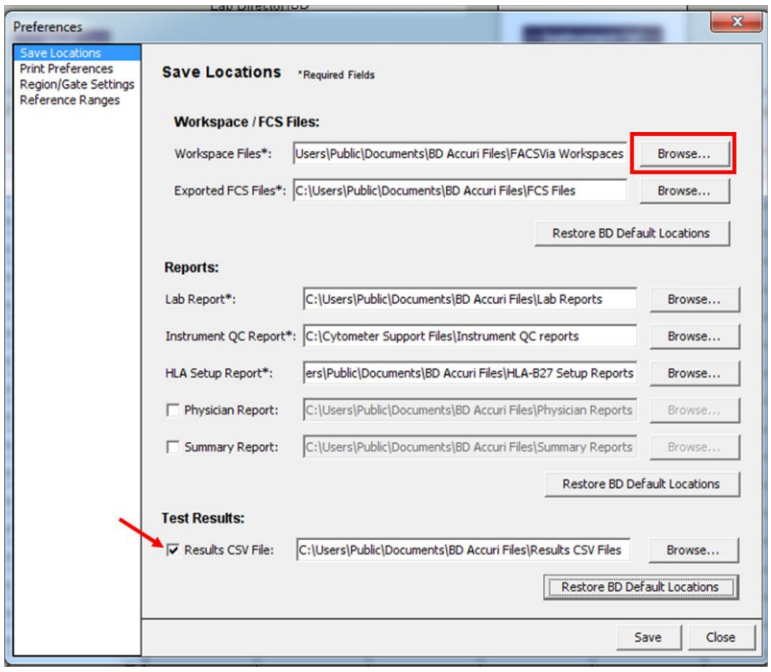
Após a realização do controle de qualidade com o BD CS&T o equipamento está pronto para uso, os próximos passos serão: criar a lista de trabalho para a leitura das amostras, a aquisição das amostras, ajuste dos gates e interpretação do Lab Report.

Preparo da lista de trabalho:

1. Inicialmente, verifique se o equipamento está programado para realizar a leitura e interpretação das amostras em plataforma única (Utilizando Tubos Trucount).
    a. Na tela principal do software, selecione **Platform > Default: Single**

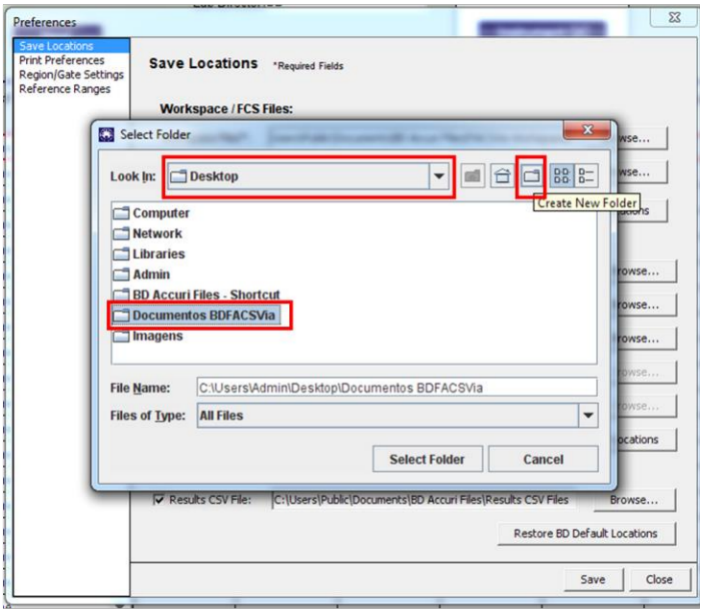
© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

2. Na parte superior esquerda, selecione os arquivos que serão salvos e o local de salvamento:
    a. Clique em **File > Preferences** (Arquivo > Preferencias)
    b. Uma janela se abrirá, em **Save Locations** (Locais de salvamento) selecione a opção **Results CSV File** (arquivo que conterá os dados e será interfaciado com o SISCEL).

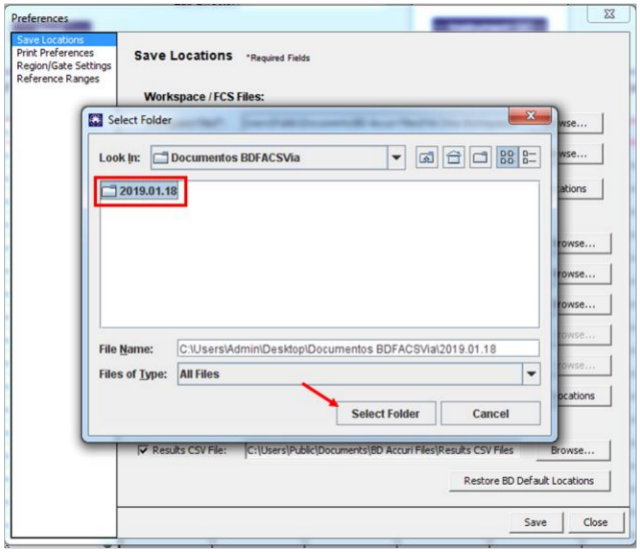


© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

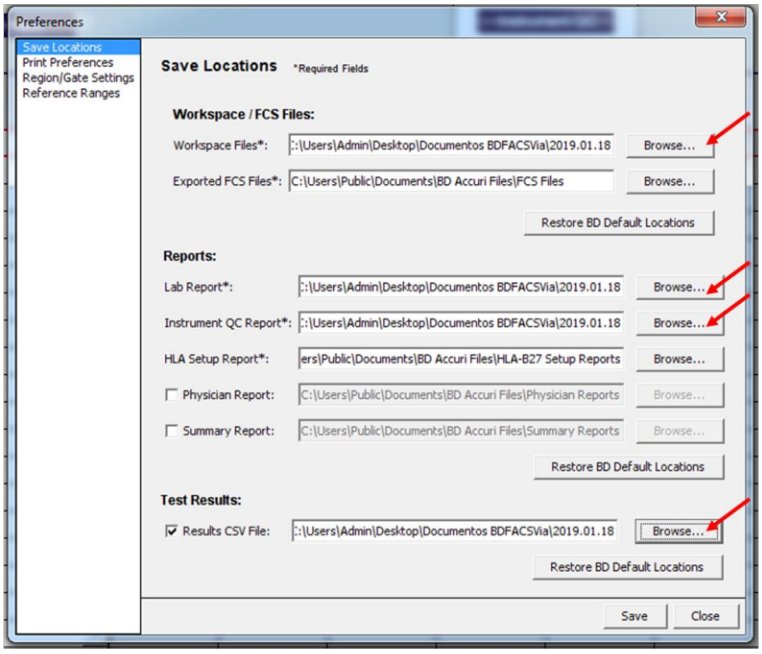
c. Para cada um dos campos, é indicado o local de salvamento dos arquivos gerados. Para melhor organização dos arquivos gerados, crie uma única pasta de salvamento dos dados em sua área de trabalho com o nome “Documentos BDFACSVia”.



d. Dentro da pasta “Documentos BDFACSVia”, crie uma pasta cujo nome é a data de realização da rotina (formato aaaa.mm.dd). Selecione esta pasta para Workspace Files, Lab Report, Results CSV File, assim todos ficarão nesta mesma pasta.

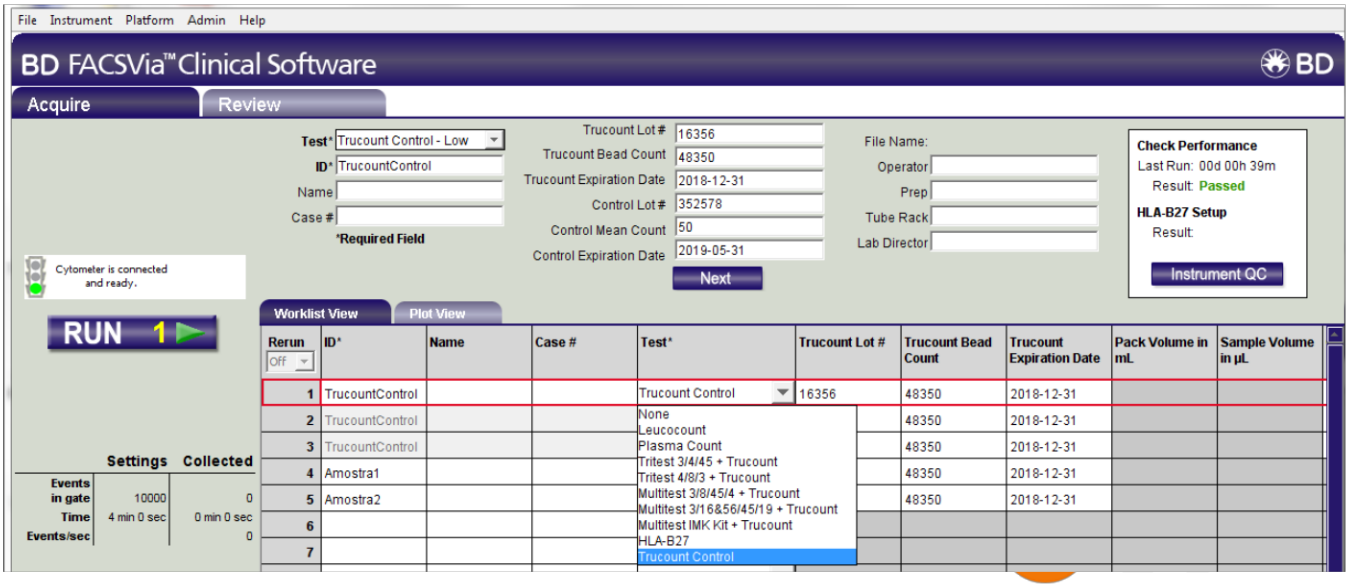


© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.



e. Crie uma nova pasta a cada novo dia de nova rotina.

3. Na parte superior da tela, selecione o teste a ser executado: **Test > BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4+Trucount**,
4. Preencha **ID** com o número de identificação do paciente
5. Insira o lote dos Tubos Trucount em **Trucount Lot #**
6. Insira em **Trucount Bead Count** a contagem de beads, como indicado no rótulo do saco de tubos trucount
7. Por fim, preencha o campo **Trucount Expiration Date** com a data de expiração (formato aaaa-mm-dd) dos tubos trucount.



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

As informações acima indicadas, automaticamente alimentarão a lista que geraremos a seguir.

Na na guia **Worklist View**, vá em Test e altere o teste para Trucount Controls. Automaticamente as 3 linhas serão alteradas para acomodar os três níveis de controle (baixo, médio e alto). A parte superior, também será alterada para incluir informações sobre os Trucount Controls.

a. Selecione a linha referente ao controle baixo (low) e na parte superior insira:
    i. O número de lote dos Trucount Controls em **Control lot #**.
    ii. Insira o valor médio de contagem esperado para o controle baixo, como indicado na caixa do produto, em **Control Mean Count**.
    iii. Insira a data de validade (formato aaaa-mm-dd) dos Trucount Controls em **Control Expiration Date.**
b. Realize os procedimentos acima, com seus respectivos valores, para os Trucount Controls médio e alto.

8. Preencha o restante da lista com a identificação das amostras as serem lidas e certifique-se de selecionar o teste **BD Multitest CD3/CD8/CD45/CD4+Trucount** na opção **Test**.
9. Insira os IDs para o operador, a pessoa que prepara as amostras, o rack de tubos e o diretor do laboratório.
10. No lado esquerdo inferior, existe a caixa de seleção **Run SIP Clean After Worklist**, se esta opção estiver selecionada o equipamento automaticamente irá realizar limpeza da SIP após executar a lista de trabalho (os tubos contendo BD FACSClean e água destilada devem ser inseridos na SIP manualmente e somente quando indicado pelo equipamento).
11. Salve o arquivo de lista de trabalho.
    a. Selecione **File > Save as** (Arquivo > Salvar como).
    b. Navegue para a pasta em que deseja salvar o arquivo.
    c. Insira um nome de arquivo e clique em **Save** (Salvar).

Você pode preencher uma lista de trabalho previamente e salvá-la. Quando estiver pronto para adquirir as amostras, é só abri-la:

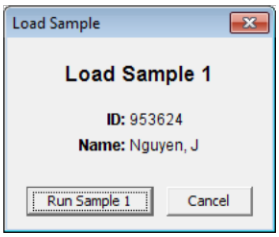
a. Selecione **File > Open FACSVia Workspace** (Arquivo > Abrir FACSVia Workspace).
b. Navegue para a pasta em que o arquivo se encontra e clique em **Open** (abrir).

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

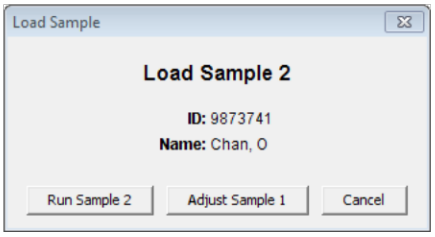
Aquisição das amostras:

Após terminar de preencher a lista de trabalho, você estará pronto para iniciar a aquisição.

2. Clique em **RUN 1** (ADQUIRIR 1).
3. Uma caixa de diálogo é aberta solicitando que você carregue a primeira amostra.



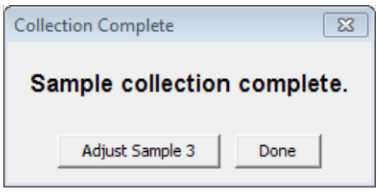
4. Homogenize a primeira amostra e carregue-a no instrumento.
5. Clique em **Run Sample 1** (Adquirir amostra 1).
    a. A **Plot View** (Exibição de gráficos) é aberta, mostrando os dados da amostra e as informações de contagem de aquisição.
6. Se necessário, você poderá realizar as seguintes tarefas durante a aquisição:
    a. Para pausar a aquisição, clique em **PAUSE** (PAUSAR). Clique em **RUN** (ADQUIRIR) e em **Run Sample X** (Adquirir amostra X) para continuar a aquisição do ponto em que ela parou.
    b. Para descartar os dados para a amostra atual, clique em ABORT RUN (CANCELAR AQUISIÇÃO). Para reiniciar a aquisição, clique em **RUN** (ADQUIRIR) e, em seguida, em **Run Sample X** (Adquirir amostra X) para carregar a amostra seguinte.
7. Quando a aquisição da amostra é concluída, uma caixa de diálogo é aberta pedindo a você para adquirir a amostra seguinte ou fazer ajustes na amostra atual. Para fazer ajustes para a amostra atual, clique em **Adjust Sample** (Ajustar amostra). O software avança para a guia **Review** (Revisão), permitindo que você faça ajustes.



8. Se desejar readquirir a amostra, clique em **Cancel** (Cancelar).
9. Homogenize e carregue a próxima amostra e clique em **Run Sample 2** (Adquirir amostra 2).

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

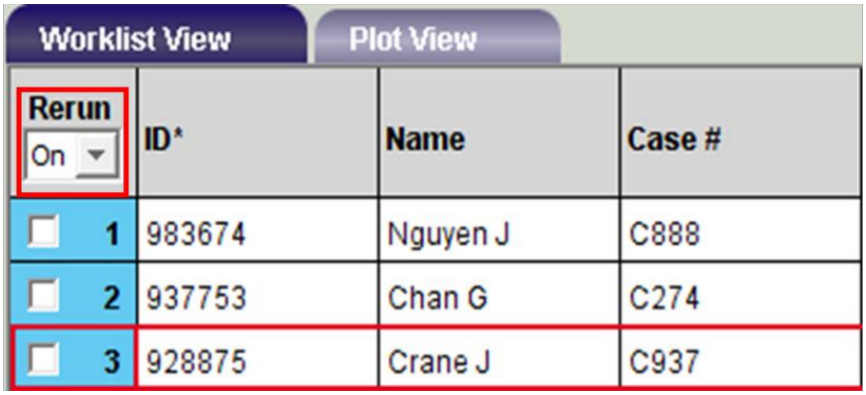
10. Continue a adquirir as amostras. Quando a aquisição da última amostra estiver concluída, clique em **Done** (Pronto).



11. Se um ponto de exclamação vermelho surgir próximo a um número de amostra na lista de trabalho, um erro de falha de hardware ocorreu. Os dados para a amostra não estão disponíveis para revisão e um Lab Report não não é gerado para a amostra correspondente..
12. Após a conclusão da aquisição, o sistema realizará uma limpeza da SIP se a caixa de seleção **Run SIP Clean After Worklist** (Realizar limpeza da SIP após lista de trabalho) estiver marcada. Um tubo de BD FACSClean, seguido por um tubo de água, serão solicitados.
13. Se a caixa de seleção **Run SIP Clean After Worklist** (Realizar limpeza da SIP após lista de trabalho) não estiver selecionada, faça uma limpeza manual da SIP selecionando **SIP Clean** (Limpeza da SIP) e siga os avisos.

Reaquisição de amostras:

14. Clique na Worklist View (Exibição de lista de trabalho) para voltar para a lista de trabalho.
15. Selecione On (Ativado) em Rerun (Readquirir) no canto superior esquerdo da guia.



16. Marque as caixas de seleção para as amostras que deseja adquirir novamente.
17. Clique em **RUN** (ADQUIRIR).
18. Uma caixa de diálogo é aberta para avisar que a reaquisição das amostras selecionadas excluirá os dados atuais.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

a. Cuidado! A reaquisição de uma amostra excluirá os dados previamente coletados para aquela amostra.

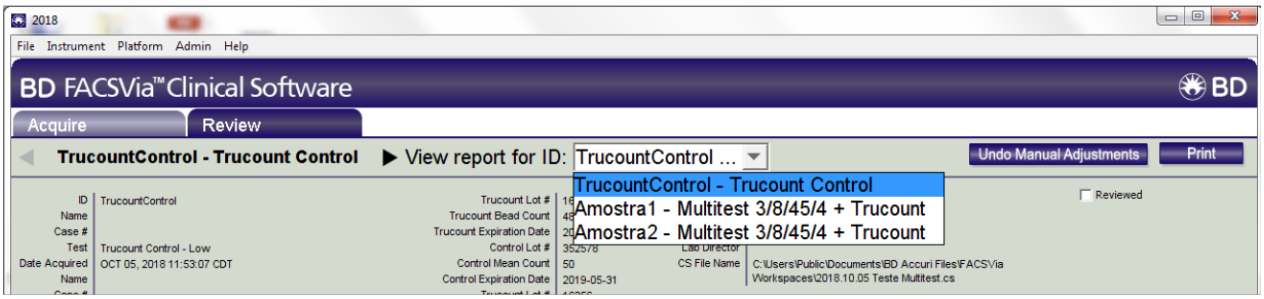
19. Clique em **Continue** (Continuar) para adquirir as amostras novamente. Para a operação manual, siga os avisos para carregar e adquirir as amostras.

Revisão de relatórios:

O software clínico BD FACSVia automaticamente define o posicionamento dos gates em torno das populações de interesse, no entanto é necessário verificar e ajustar os gates caso seja necessário. Após os ajustes os novos valores são automaticamente calculados.

Para ajustar regiões:

20. Após a conclusão da aquisição, clique na guia **Review** (Revisão).
21. Selecione o ID e o teste para o relatório de amostra que deseja exibir no menu **View report for ID** (Exibir relatório para ID).

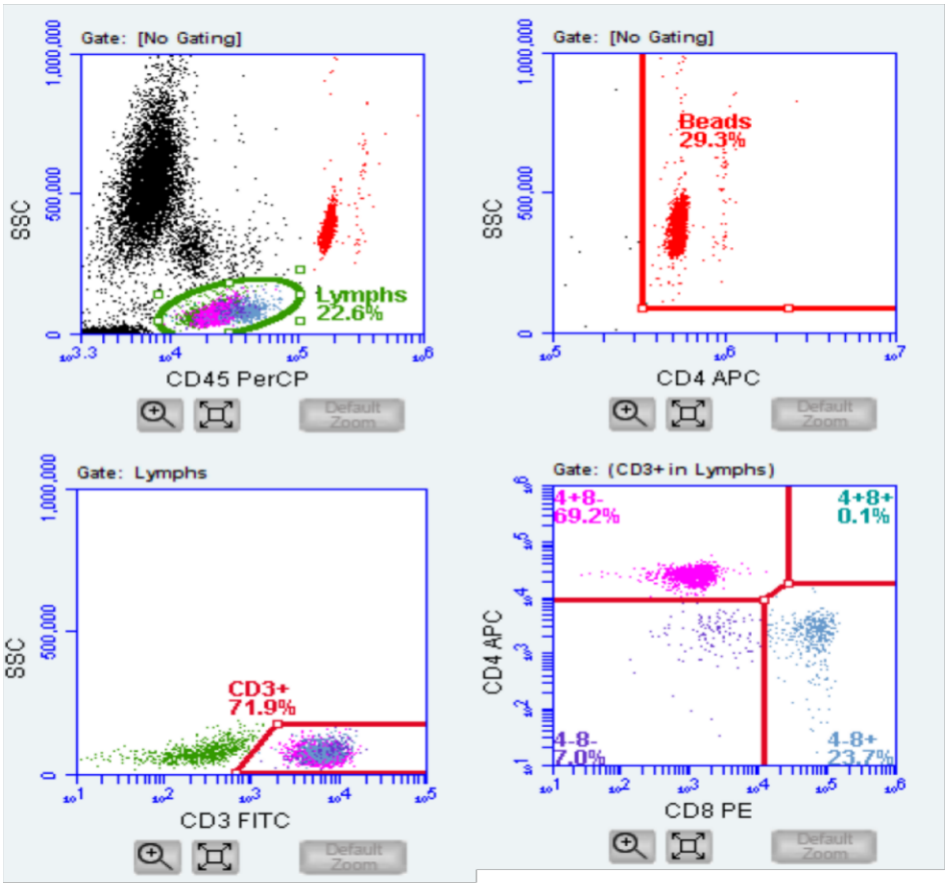


22. Clique na região para selecioná-la.
    a. Ela é mostrada com um contorno vermelho forte e alças (exemplos mostrados).
23. Ajuste as regiões:
    a. Para ajustar o tamanho de uma região em qualquer direção, coloque o cursor sobre uma alça. Uma seta com duas pontas ou cruz é mostrada, dependendo da forma da região. Clique e arraste na direção apropriada. Quando você ajusta uma alça de canto de uma região retangular, a região muda automaticamente de volta para um retângulo.
    b. Para mover uma região inteira em qualquer direção, coloque o cursor sobre uma área que não seja uma alça. Uma seta apontando para quatro lados é mostrada. Clique e arraste para mover a região.
    c. Para girar uma região elíptica, coloque o cursor sobre uma das oito alças de canto até ver uma seta curvada apontando para os dois lados. Clique e arraste para girar a região.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

d. As contagens de eventos e os resultados são atualizados automaticamente.

24. Se desejar reverter para as configurações padrão da BD, selecione **Undo Manual Adjustments** (Desfazer ajustes manuais) no canto superior direito da guia **Review** (Revisão).



FASE PÓS-ANALÍTICA

Interpretação de resultados

Amostras

Após a leitura de cada amostra, o BD FACSVia Clinical Software 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 e a análise de consistência deve ser executada. O **Physician Report** é um laudo resumido.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Multitest 3/8/45/4 + Trucount — Lab Report

ID: 232424

Report Date: APR 17, 2015 15:54:00

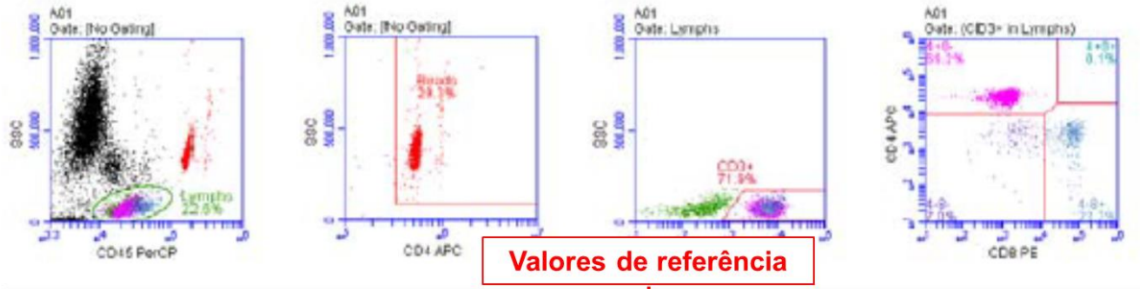
BD FACSVia Serial #: Demo St
BD FACSVia Software Version:

Name:
Case #:

Date Acquired	APR 16, 2015 16:28:16	**Operator**	pt
Trucount Lot #	61983	**Prep**	
Trucount Bead Count	49982	**Tube Rack**	
Trucount Expiration Date	OCT 15, 2015	**Lab Director**	LJO

BD FACSVia File Name: C:\Users\Public\Documents\BD Accuri Files\FACSVia Workspaces\multitest 38454.cs

Multitest 3/8/45/4 + Trucount



Valores de referência

	Result	Ref. Range 1	Ref. Range 2
CD45+ Lymphs Events	2705	-	-
Beads Events	1590	-	-
CD45+ Lymphs Abs Count (cells/µL)	1701	-	-
CD3+ Percent of Lymphs	71.90%	-	-
CD3+ Abs Count (cells/µL)	1223	-	-
CD3+ CD4+ Percent of Lymphs	49.83%	-	-
CD3+ CD4+ Abs Count (cells/µL)	847	-	-
CD3+ CD8+ Percent of Lymphs	17.12%		
CD3+ CD8+ Abs Count (cells/µL)	291		
CD3+ CD4+ CD8- Percent of Lymphs	49.76%		
CD3+ CD4+ CD8- Abs Count (cells/µL)	846		
CD3+ CD4- CD8+ Percent of Lymphs	17.04%		
CD3+ CD4- CD8+ Abs Count (cells/µL)	290		
CD3+ CD4+ CD8+ Percent of Lymphs	0.07%	-	-
CD3+ CD4+ CD8+ Abs Count (cells/µL)	1	-	-
CD3+ CD4- CD8- Percent of Lymphs	5.03%	-	-
CD3+ CD4- CD8- Abs Count (cells/µL)	86	-	-
4/8 Ratio	2.91	-	-
Percent T-Sum	7.0%	-	-

Valores obtidos em nº de eventos (events), porcentagem (%) e contagem absoluta (cels/µL)

QC Messages

Gate was manually modified.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Valores mínimos necessários:

- CD45+ Lymphs Events (Linfócitos) ≥ 2500 eventos

- Beads Events ≥ 600 eventos

A análise de consistência dos resultados também deve ser realizada:

- Pureza do gate de linfócitos (CD45 x SSC)

- A soma (% ou cels/µl) de CD3+CD4+CD8- mais CD3+CD4-CD8+ mais CD3+CD4+CD8+ mais CD3+CD4-CD8- deve ser igual a CD3+

	Result	Ref. Range 1	Ref. Range 2
CD45+ Lymphs Events	2705	-	
Beads Events	1590	-	
CD45+ Lymphs Abs Count (cells/µL)	1701	-	
CD3+ Percent of Lymphs	71.90%	-	
CD3+ Abs Count (cells/µL)	1223	-	
CD3+ CD4+ Percent of Lymphs	49.83%	-	-
CD3+ CD4+ Abs Count (cells/µL)	847	-	-
CD3+ CD8+ Percent of Lymphs	17.12%	-	-
CD3+ CD8+ Abs Count (cells/µL)	291	-	-
CD3+ CD4+ CD8- Percent of Lymphs	49.76%		
CD3+ CD4+ CD8- Abs Count (cells/µL)	846		
CD3+ CD4- CD8+ Percent of Lymphs	17.04%		
CD3+ CD4- CD8+ Abs Count (cells/µL)	290		
CD3+ CD4+ CD8+ Percent of Lymphs	0.07%		
CD3+ CD4+ CD8+ Abs Count (cells/µL)	1		
CD3+ CD4- CD8- Percent of Lymphs	5.03%		
CD3+ CD4- CD8- Abs Count (cells/µL)	86		
4/8 Ratio	2.91	-	-
Percent T-Sum	7.0%	-	-

≥ 2500 eventos

≥ 600 eventos

49,76+17,04+0,07+5,03 = 71,90%

OU

846+290+1+86 = 1223 cels/µL

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

O BD FACSVia Clinical Software 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 rosa no gráfico CD8xCD4 é exatamente a mesma população rosa que aparece no gráfico CD3xSSC, que é exatamente a mesma população rosa vista no gráfico CD45xSSC. O mesmo raciocínio vale para as demais cores (vermelho, verde-azulado, roxo, azul e verde).

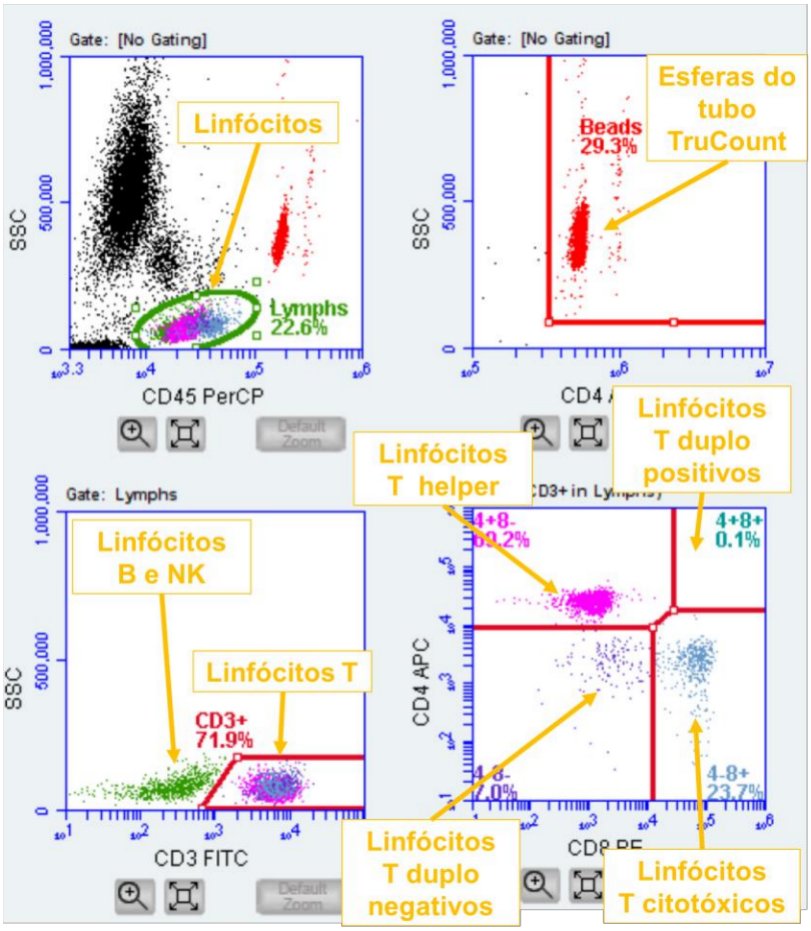


Figura 26: Populações celulares

O BD FACSVia Clinical Software gera valores celulares em números de eventos (events), valores percentais (%Lymph) e absolutos (Abs Count), sendo que para esse último é necessária a utilização dos tubos BD TruCount no preparo da rotina.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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.

% de células = <u>Número de eventos dentro da região de interesse x 100</u>
Número de eventos de linfócitos (CD45+ *Lymph Events*)

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

Já os valores absolutos (células/μL) são gerados com o auxílio dos tubos BD TruCount. 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:

Name:
Case #:

Date Acquired	APR 16, 2015 16::
Trucount Lot #	61983
Trucount Bead Count	49982
Trucount Expiration Date	OCT 15, 2015

BD FACSVia File Name: C:\Users\Public\Docume

	Result
CD45+ Lymphs Events	2705
Beads Events	1590
CD45+ Lymphs Abs Count (cells/µL)	1701
CD3+ Percent of Lymphs	71.90%
CD3+ Abs Count (cells/µL)	1223
CD3+ CD4+ Percent of Lymphs	49.83%
CD3+ CD4+ Abs Count (cells/µL)	847
CD3+ CD8+ Percent of Lymphs	17.12%
CD3+ CD8+ Abs Count (cells/µL)	291
CD3+ CD4+ CD8- Percent of Lymphs	49.76%
CD3+ CD4+ CD8- Abs Count (cells/µL)	846
CD3+ CD4- CD8+ Percent of Lymphs	17.04%
CD3+ CD4- CD8+ Abs Count (cells/µL)	290
CD3+ CD4+ CD8+ Percent of Lymphs	0.07%
CD3+ CD4+ CD8+ Abs Count (cells/µL)	1
CD3+ CD4- CD8- Percent of Lymphs	5.03%
CD3+ CD4- CD8- Abs Count (cells/µL)	86
4/8 Ratio	2.91
Percent T-Sum	7.0%

Volume de sangue lido:

$$nº\ de\ Beads\ contadas \times \frac{Volume\ de\ sangue\ pipetado\ (\mu L)}{Nº\ total\ de\ Beads\ no\ tubo}$$

Contagem absoluta de linfócitos CD45+:

$$\frac{nº\ de\ eventos\ CD45+\ contados}{volume\ de\ sangue\ lido\ (\mu L)}$$

Volume de sangue lido:

$$1590 \times \frac{50\mu L}{49982} = 1{,}59\mu L \text{ de sangue}$$

Contagem absoluta de linfócitos CD45+:

$$\frac{2705}{1{,}59\mu L} = 1701{,}25\ \text{Cels}/\mu L$$

Figura 27: Contagens Absolutas – Lab Report.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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.

Dentro do quadro de valores gerados é possível encontrar a relação entre linfócitos T helper e linfócitos T citotóxicos, antigamente chamados de linfócitos T supressores. A representação dessa relação é ***4/8 ratio***. A razão 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 linfócitosT helper for dividida pelos mesmos 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 (CD45+ *Lymphs Events*) que deve ser maior ou igual a 2500 **e** o número de eventos de *beads* (*Beads Events*) que deve ser maior ou igual a 600.

Controles

A interpretação dos resultados dos controles é muito similar à dos resultados das amostras. É necessário verificar se os números mínimos de eventos de *beads* dos tubos TruCount foram atingidos.

A diferença deste tubo para um tubo de amostra é que neste caso apenas um gráfico FITCxPE é apresentado e as beads do TruCount Controls aparecem como um grupo de eventos verdes. Assim como as *beads* dos tubos TruCOUNT, as *beads* TruCOUNT Controls são também positivas para os quatro fluorocromos (FITC, PE, PerCP e APC), porém possuem intensidade de fluorescência menor para o PE (aparecem abaixo das beads do tubo TruCount no gráfico FITCxPE).

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

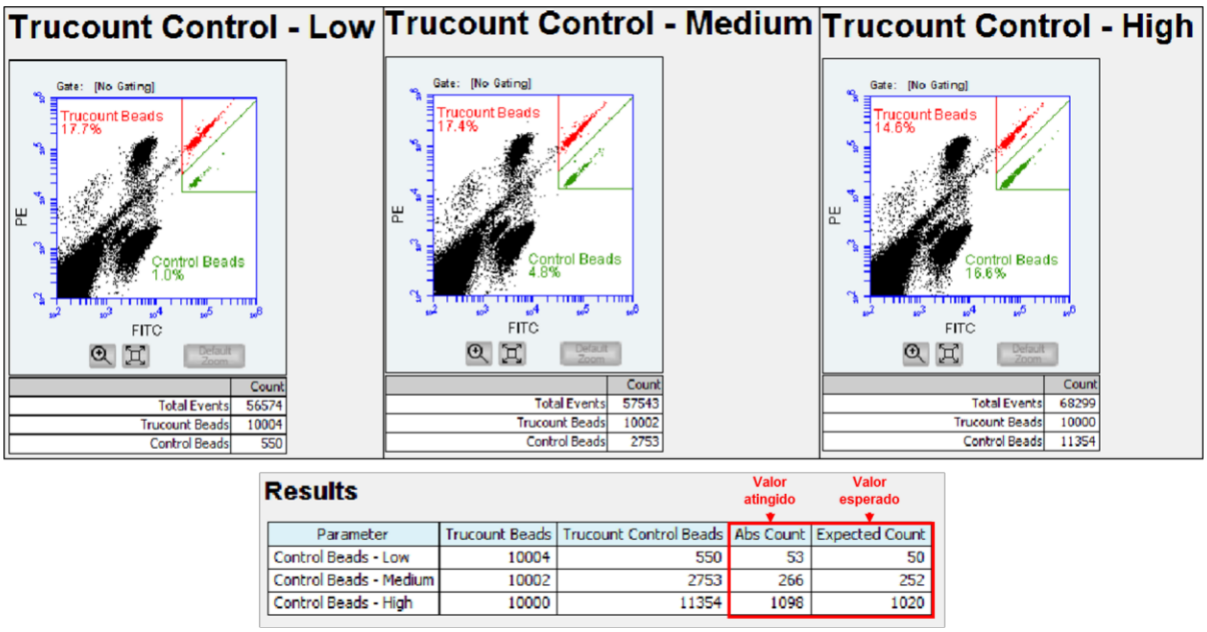


Figura 28: Visualização do Controle baixo (*Low*), médio (*Medium*) e alto (*High*).

Como a contagem absoluta correta de cada controle é conhecida, um resultado fora do intervalo esperado (± 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).

Regras de Westgard na rotina CD4/CD8

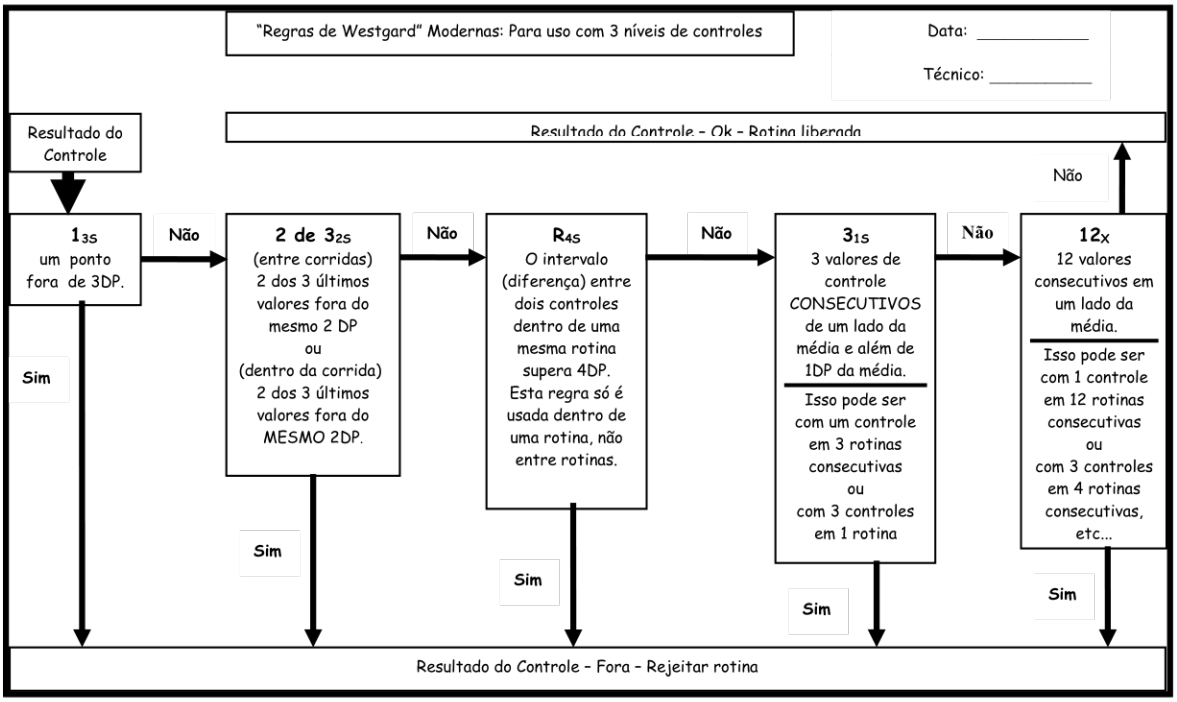
No ano de 2008 o Departamento de DST, Aids e hepatites virais iniciou a implementação do sistema de avaliação e monitoramento da qualidade através de planilhas eletrônicas específicas para a construção de gráficos de Levy-Jennings e aplicação das regras de Westgard para interpretações e tomadas de ações corretivas quando necessárias. O programa disponibiliza no em sua página na internet (http://www.aids.gov.br) em **Profissionais de saúde > Rede de laboratórios > Rede Nacional de Laboratórios de CD4+/CD8+** os arquivos para a construção dos gráficos de Levy-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;

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

- ✓ No arquivo em formato “Excel” – Planilha CQ FACSVia – do gráfico de Levy-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 Controls.
- ✓ As telas do lado direito de cada gráfico referentes ao TruCount Control, 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, a linhas do gráfico de Levy-Jennings são desenhadas e a medida que os valores dos controles forem sendo digitados, os respectivos gráficos serão construídos, momento em que deverão ser aplicadas as Regras de Westgard seguindo o fluxograma para a avalição da rotina de trabaho.

Fluxograma das Regras de Westgard



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

As informações técnicas apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 5: Data Acqisition e no manual “BD FACSVia CD4 Application Guide” na sessão BD Multitest assays.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

EXERCÍCIOS 5

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

_____

_____

2. Após a coleta, em quanto tempo o sangue deve ser preparado para a leitura no FACSVia? E após preparada, em quanto tempo a amostra pode ser lida?

_____

_____

_____

_____

3. Como devemos pipetar o sangue? Por quê?

_____

_____

_____

_____

4. 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?

_____

_____

_____

_____

5. Devemos agitar bem os tubos dos TruCOUNT Controls antes de pipetá-los ou isto é desnecessário? Explique.

_____

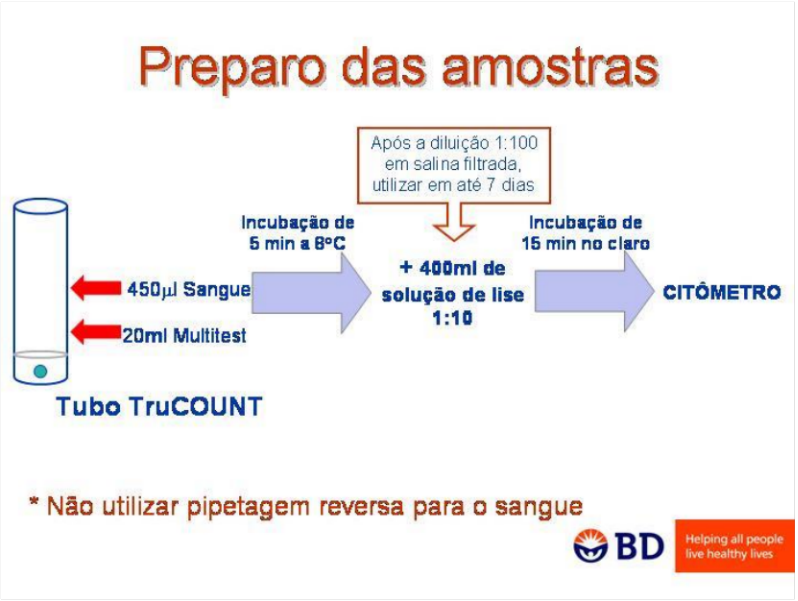
_____

_____

_____

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

6. Nas figuras abaixo, indique e corrija os erros (se houver):



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

LIMPEZA E MANUTENÇÃO DO EQUIPAMENTO

ATENÇÃO!!! Sempre utilize equipamentos de proteção (jaleco, luvas e óculos) ao executar as manutenções. As peças entram em contato com as amostras e, portanto, apresentam risco biológico.

MANUTENÇÕES DIÁRIAS

Manutenção após aquisição e desligamento:

1. Após a conclusão da aquisição da lista de trabalho, o sistema realizará a limpeza da SIP se a caixa de seleção **Run SIP Clean After Worklist** (Realizar limpeza da SIP após lista de trabalho) estiver marcada. Um tubo de BD FACSClean, seguido por um tubo de água, serão solicitados.
2. Se a caixa de seleção **Run SIP Clean After Worklist** (Realizar limpeza da SIP após lista de trabalho) não estiver selecionada, faça uma limpeza manual da SIP selecionando **SIP Clean** (Limpeza da SIP) e siga os avisos.
3. Pressione o botão liga/desliga na parte da frente do citômetro para desligá-lo. Deixe o tubo de água na SIP.
4. O ciclo **Clean Fluidics** (Limpeza do sistema de fluidos) é executado por aproximadamente 13 minutos e, em seguida, o citômetro desliga.

Observação: Precionar o botão de desligar por um longo período (3 segundos) força o desligamento do BDFACSVia sem a realização **Clean Fluidics** (Limpeza do sistema de fluidos).

5. Selecione **File > Quit** (Arquivo > Sair) para sair do software:
    a. Clique em **Yes** (Sim) ao ser avisado para salvar as alterações no espaço de trabalho.
6. Descarte, como recomendado pela instituição, o material presente no tanque de descarte
7. Realize a Limpeza da parte externa do Instrumento:
    a. Umedeça uma toalha de papel com solução BD FACSClean.
    b. Limpe os painéis externos e a base da amostra.
    c. Umedeça uma toalha de papel limpa com água DI e limpe as áreas em que você passou a solução BD FACSClean.
    d. Descarte as toalhas de papel como lixo de risco biológico

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Além do procedimento acima as manutenções abaixo podem ser realizadas quando necessário:

Tarefa	Quando realizar
Retrolavagem da SIP (Backflush)	Em caso de suspeita de uma obstrução na SIP ou para retirada de bolhas
Limpeza da SIP (SIP Clean)	Na conclusão de cada lista de trabalho ou mais frequentemente se desejado
Limpeza do sistema de fluidos	Ocorre automaticamente durante desligamento

Retrolavagem da SIP (Backflush)

O ciclo de retrolavagem força a saída do fluido da célula de fluxo e da SIP para remover bolhas na célula de fluxo e/ou obstruções na SIP. Realize uma retrolavagem se você observar uma redução ou interrupção da taxa de eventos e suspeitar de uma obstrução.

Você pode usar um ciclo de retrolavagem para verificar entupimentos ou falhas na tubulação. Durante uma retrolavagem, algumas gotas de fluido são dispensadas pela SIP, seguidas por um fluxo constante de fluído, seguido por mais algumas gotas. Se você não observar um fluxo constante, ou se o fluxo estiver saindo da SIP em ângulo, a SIP poderá estar entupida. Se nenhum fluido for dispensado, poderá haver um problema com os filtros do tanque de fluido ou com a tubulação peristáltica.

Para realizar a Retrolavagem da SIP:

1. Coloque um tubo vazio na SIP.
2. Selecione **Instrument > Run Backflush cycle** (Instrumento > Realizar ciclo de retrolavagem).
    a. Você também pode clicar em **Backflush** (Retrolavagem) na guia **Acquire** (Aquisição).
3. Clique em Backflush (Retrolavagem) na caixa de diálogo que solicita a colocação de um tubo vazio.
4. Quando a retrolavagem estiver concluída, descarte o tubo da mesma forma que você faria com qualquer amostra de risco biológico para garantir que não haja riscos à segurança.

Limpeza da SIP (SIP Clean):

Uma limpeza da SIP será realizada automaticamente no fim de cada lista de trabalho se a caixa de seleção **Run SIP Clean After Worklist** (Realizar limpeza da SIP após lista de trabalho) for selecionada na guia **Acquire** (Aquisição). No entanto, recomendamos sempre realizar uma limpeza da SIP ao fim de cada lista de trabalho. Você também pode realizar uma limpeza da SIP com a frequência que desejar para evitar obstruções.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Se você deixar o instrumento ocioso por 15 minutos ou mais ao adquirir amostras, realize uma limpeza da SIP antes de reiniciar a operação para limpar a SIP e evitar obstruções.

Para realizar a limpeza da SIP:

1. Clique em **SIP Clean** (Limpeza da SIP) na guia **Acquire** (Aquisição).
    a. Uma caixa de diálogo solicitará que você coloque um tubo com 2 ml de BD FACSClean.
2. Coloque o tubo do BD FACSClean e clique em **Clean** (Limpar).
    a. Quando a etapa 2 estiver concluída, uma caixa de diálogo solicitará que você coloque um tubo com 2 ml de água.
3. Coloque o tubo de água e clique em **Clean** (Limpar).

Limpeza do sistema de fluidos:

O ciclo de limpeza de fluidos será realizado automaticamente quando o instrumento for desligado. Você também pode realizá-lo a qualquer momento, se necessário. Durante o ciclo de limpeza de fluidos, a solução BD FACSClean é passada pelas linhas de fluidos, seguido por Solução de sheath. Um segundo ciclo passará solução detergente pelas linhas de fluidos, seguida por Solução de sheath. A limpeza de fluidos leva cerca de 13 minutos.

Para limpar os fluidos:

1. Coloque um tubo com 2 ml de água DI na SIP.
2. Selecione **Instrument > Run Clean Fluidics** (Instrumento > Executar Limpeza do sistema de fluidos).

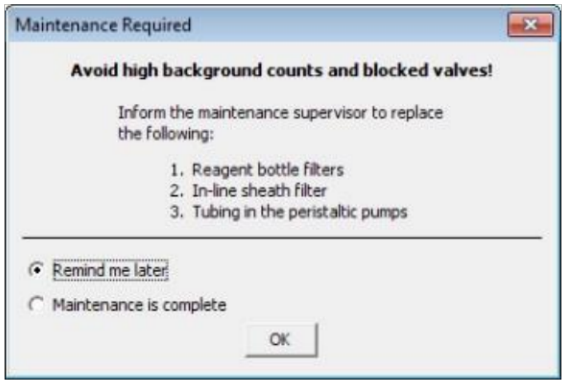
MANUTENÇÕES PROGRAMADAS:

As manutenções devem ser executadas de acordo com a peridiocidade indicada:

Tarefa	Quando realizar
Limpeza dos tanques de fluido	Uma vez por mês
Substituição dos filtros dos tanques de fluido	A cada 2 meses (ou quando 35L da Solução de sheath tiverem sido usados)
Substituição do filtro em linha de Solução de sheath	
Substituição da tubulação de bomba peristáltica	

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Como na tabela acima, a cada 2 meses (ou quando 35L da Solução de sheath tiverem sido usados) é necessario realizar algumas manutenções no BD FACSVia. Uma caixa de diálogo será automaticamnte exibida nesse momento para lembrá-lo de realizar a manutenção agendada. Quando a caixa de diálogo for exibida, conclua a manutenção, selecione a opção **Mantenance is complete** (Conclusão de manutenção) e clique em **OK**. Se você selecionar **Remind me later** (Lembrar-me mais tarde), a mensagem será exibida novamente em 5 dias.



Limpeza dos tanques de fluido:

Limpe os tanques da Solução de sheath, solução detergente e BD FACSClean e de descarte a cada mês para garantir que resíduos e contaminantes não sejam acumulados dentro deles. Não permita que os filtros de tanques sequem ao limpar os tanques.

Para limpar tanques de fluido:

1. Desconecte e esvazie todos os tanques.
2. Enxágue os tanques com água DI.
3. Enxágue os tanques com solução de hipoclorito 0,5 - 1%.
4. Enxágue completamente os tanques com água DI 2 ou 3 vezes para remover os resíduos de solução de hipoclorito.
5. Preencha cada tanque com o fluido apropriado.
6. Recoloque as tampas nos tanques de fluido.
7. Encaixe a tubulação codificada com cores de volta nas uniões ao empurrar firmemente até ouvir um clique

Substituição dos filtros dos tanques de fluido:

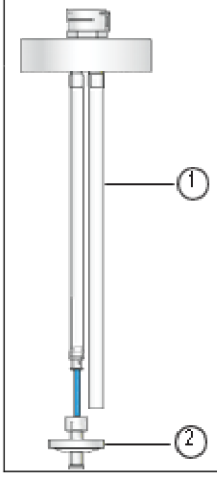
Cada tanque de Solução de sheath, BD FACSClean e detergente contém um filtro em disco. Recomendamos substituir esses filtros a cada 2 meses.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Para substituir os filtros dos tanques de fluidos:

1. Desconecte as linhas de conexão rápida da parte superior de cada tanque.
2. Remova com cuidado a tampa de cada tanque.
3. Desconecte o conector Luer do filtro no fim da tubulação de fluidos. Descarte o filtro como você faria com amostras biológicas.

A tabela a seguir descreve os componentes do conjunto de tampas de tanques.

	Nº	Componente	Descrição
	1	Sensor de fluidos	Detecta fluido no tanque.
	2	Filtro em disco	Filtra o fluido do tanque.

4. Substitua o filtro pelo mesmo tipo de filtro.
5. Remonte os tanques e reconecte as linhas de conexão rápida.

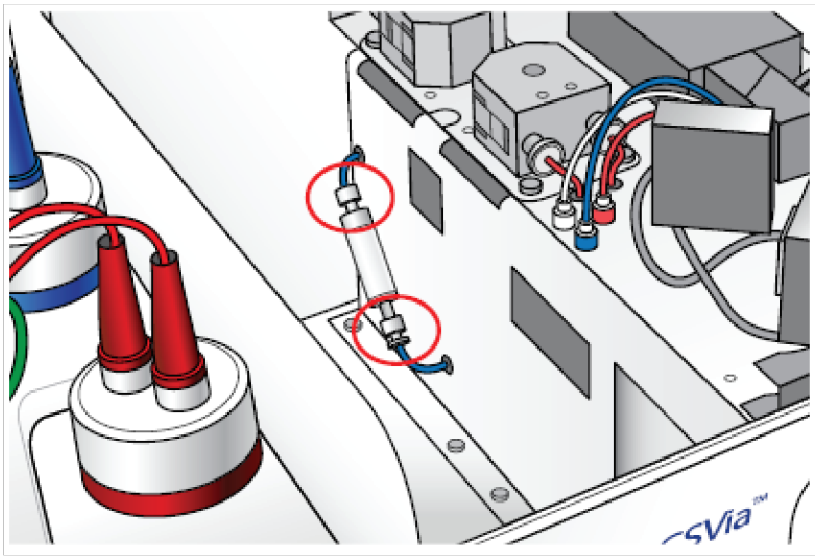
Substituição do filtro em linha de Solução de sheath:

Recomendamos substituir o filtro de solução de Sheath em linha a cada 2 meses. No entanto, se você observar uma descoloração amarela, vazamento de fluidos, ou se o filtro estiver menos de 50% cheio, troque o filtro imediatamente.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Para substituir o filtro de solução de Sheath em linha:

1. Desligue o citômetro.
    a. O ciclo **Clean Fluidics** (Limpeza do sistema de fluidos) é executado por aproximadamente 13 minutos. Em seguida, o citômetro desliga automaticamente.
2. Levante a tampa do citômetro e remova a cesta de armazenamento plástica.
3. Toda vez que você trocar o filtro de solução de Sheath em linha, inspecione visualmente se há vazamentos de fluidos em toda a tubulação e conectores.
    a. Procure líquidos, resíduos secos ou descoloração das superfícies metálicas em qualquer lugar próximo à tubulação.
    b. Se você observar qualquer evidência de vazamento, entre em contato com o Suporte Técnico da BD Biosciences.
4. Torça as travas Luer em ambas as extremidades do filtro de solução de Sheath em linha para desconectar as travas. Não puxe a tubulação.



5. Descarte o filtro.
    a. Embora o material de amostra não passe através deste filtro, recomendamos descartá-lo da mesma forma que qualquer amostra de risco biológico para garantir que não haja riscos à segurança.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

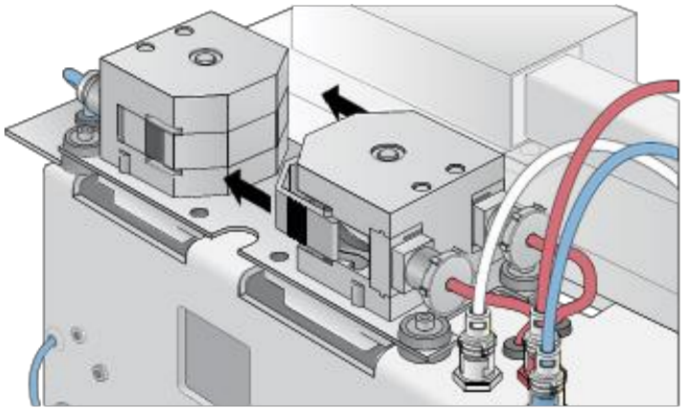
6. Instale um novo filtro de solução de Sheath em linha ao reconectar as uniões Luer.
    a. Este filtro possui extremidades macho e fêmea para garantir que ele possa ser instalado somente na orientação correta.
7. Recoloque a cesta de armazenamento plástica e feche a tampa do citômetro.
    a. Coloque um tubo de amostra com água DI na SIP.
8. Ligue o citômetro.
    a. Ao inicializar, talvez você veja uma mensagem de erro indicando que um erro de sistema de fluidos foi detectado. Esse erro é normal após substituir o filtro de solução de Sheath em linha.

Substituição da tubulação de bomba peristáltica:

Este tópico descreve como substituir a tubulação para as bombas peristálticas. O citômetro inclui duas bombas peristálticas — uma bomba de solução de Sheath e uma bomba de descarte. Substitua a tubulação da bomba a cada 2 meses. Recomendamos substituir ambas as peças de tubulação ao mesmo tempo.

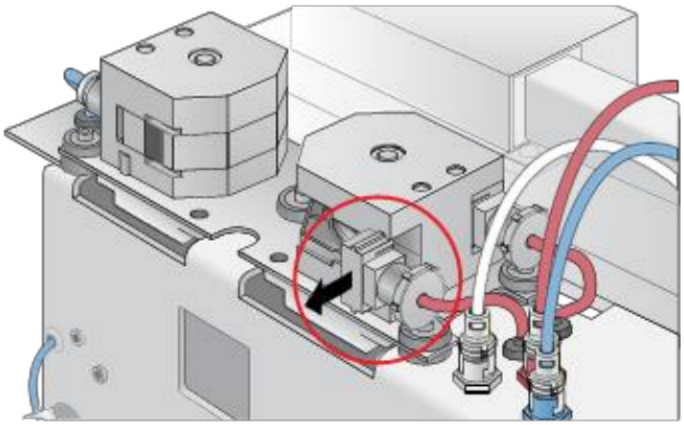
Para substituir a tubulação da bomba:

1. Desligue o citômetro.
    a. O ciclo Clean Fluidics (Limpeza do sistema de fluidos) é executado por aproximadamente 13 minutos. Em seguida, o citômetro desliga automaticamente.
2. Levante a tampa do citômetro.
3. Pressione as marcas de apoio em ambos os lados do clipe retentor da bomba para remover o clipe.

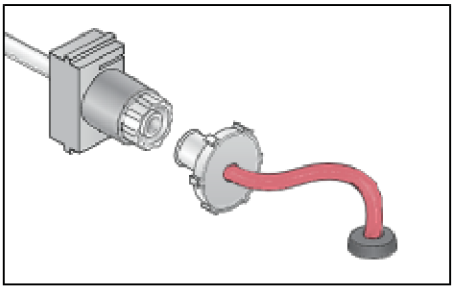


4. Puxe os conectores Luer com cuidado para fora, deslizando as uniões para fora da cabeça da bomba.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.



5. Desconecte a tubulação ao desaparafusar os conectores Luer plásticos (um total de quatro conectores - dois para cada bomba).
    a. A tubulação azul é conectada à bomba de solução de Sheath e tubulação vermelha à bomba de descarte.



6. Remova a tubulação da cabeça da bomba e descarte-a como amostra biológica de acordo com protocolos e regulamentações de laboratório padrão.
    a. A amostra passará através da tubulação desta bomba. Considere-a como risco biológico.
7. Instale a nova tubulação da bomba peristáltica ao deslizar as uniões Luer na cabeça da bomba e encaixar a conexão no lugar.
8. Substitua o clipe retentor da bomba.
9. Reconecte a tubulação aos conectores Luer.
    a. Certifique-se de que as uniões Luer estejam conectadas aos elementos de tubulação corretos. Também certifique-se de que ao apertar as uniões, a tubulação não seja torcida ou dobrada. Se ela for torcida, desaparafuse a união Luer, gire-a no sentido anti-horário e, em seguida, a reaperte.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

10. Feche a tampa do citômetro com cuidado.
11. Coloque um tubo de amostra com água DI na SIP, ou se estiver usando um Loader, certifique-se de que haja um tubo com 2 ml de água na posição de quadrado ( ).
12. Ligue o citômetro.
    a. Ao inicializar, talvez você veja uma mensagem de erro indicando que um erro de sistema de fluidos foi detectado. Esse erro é normal após substituir a tubulação de bomba peristáltica.

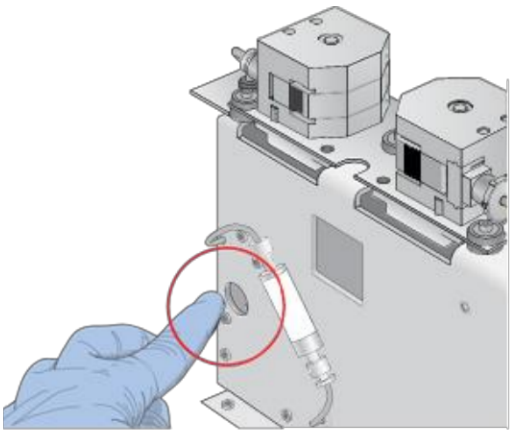
MANUTENÇÕES EXTRAS (REALIZADAS SOMENTE APÓS ORIENTAÇÃO TÉCNICA DA BD)

Esvaziamento das linhas de sensores de fluidos:

Realize este procedimento se a mensagem de luz de status indicar que a solução de Sheath está vazia ou o descarte está cheio, mas todos os níveis de fluidos estão como deveriam. Fluido nas linhas de detecção pode gerar mensagens de nível de fluido incorretas.

Para esvaziar as linhas de detecção de fluidos:

1. Comece com o instrumento desligado.
2. Certifique-se de que o tanque de solução de Sheath esteja cheio e o tanque de descarte esteja vazio, exceto por solução de hipoclorito. Coloque o tanque de solução de Sheath na bancada onde você possa monitorar o nível de fluido.
3. Levante a tampa do citômetro e remova a cesta de armazenamento plástica.
4. Localize o orifício de acesso arredondado do tamanho de um dedo próximo ao filtro de solução de Sheath em linha.
5. Coloque seu dedo sobre o pequeno buraco dentro do orifício de acesso.



6. Com o dedo vedando o pin hole, ligue o citômetro.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

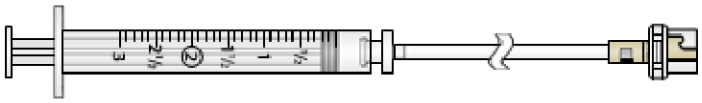
7. Mantenha seu dedo sobre o orifício por 30 segundos. Você deve observar continuamente bolhas no tanque de solução de Sheath.
8. Após 30 segundos, remova seu dedo.
9. Recoloque a cesta de armazenamento e feche a tampa para permitir que o citômetro conclua a inicialização normal de fluidos.

Desobstrução da SIP:

Antes de usar a seringa para desobstruir a SIP, tente desobstruir a SIP realizando várias retrolavagens seguidas por várias limpezas da SIP. Realize a desobstrução da SIP com seringa se ela continuar obstruída mesmo após a realização de retrolavagens e limpezas da SIP.

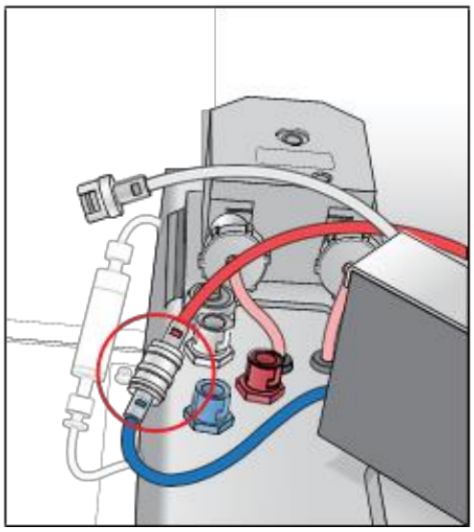
Para desobstruir a SIP:

1. Monte uma seringa da seguinte forma:
    a. Conecte o conector Luer fêmea, tubulação e acoplamento de conexão rápida.
    b. Conecte o conjunto de tubulação a uma seringa de 3 ml, como mostrado.

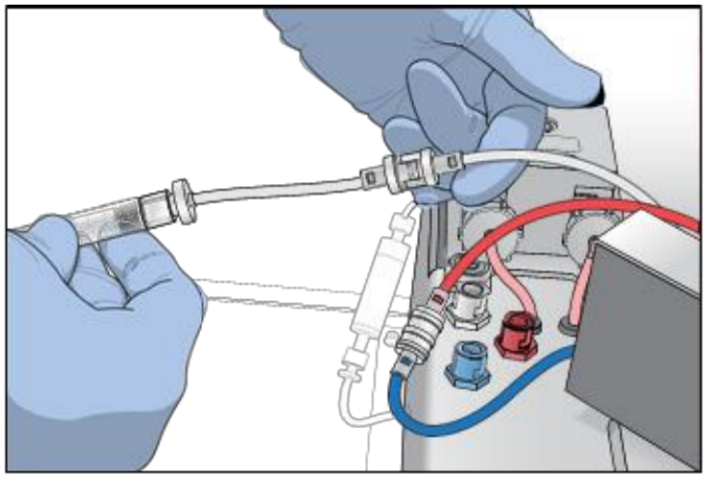


2. Desligue o citômetro.
    a. O ciclo Clean Fluidics (Limpeza do sistema de fluidos) é executado por aproximadamente 13 minutos. Em seguida, o citômetro desliga automaticamente.
3. Levante a tampa do citômetro.
4. Desconecte as três linhas de fluido da célula de fluxo (solução de Sheath - azul, descarte – vermelho e esvaziamento - transparente) do chassi ao girar cada conector aproximadamente 1/8 de volta o sentido anti-horário.
5. Conecte as linhas azul (solução de Sheath) e vermelha (descarte) entre si alinhando os conectores juntos e girando ligeiramente.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.



6. Encha a primeira seringa com BD FACSClean.
7. Certifique-se de que um tubo vazio esteja instalado na SIP.
8. Conecte a seringa à linha transparente (esvaziamento) alinhando os conectores e girando ligeiramente.



9. Pressione lentamente o êmbolo na seringa, empurrando a solução de limpeza para a célula de fluxo e para fora da SIP.
10. Puxe lentamente o êmbolo para puxar a solução de limpeza de volta para a seringa.
11. Repita o ciclo de empurrar/puxar mais algumas vezes para garantir que a obstrução seja eliminada. Conclua empurrando BD FACSClean no tubo.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

12. Encha a segunda seringa com água DI.
13. Instale um tubo vazio na SIP.
14. Conecte a seringa na linha transparente (esvaziamento).
15. Pressione lentamente o êmbolo na seringa, empurrando a água para a célula de fluxo e para fora da SIP.
16. Puxe lentamente o êmbolo para puxar a água de volta para a seringa.
17. Repita o ciclo de empurrar/puxar mais algumas vezes para garantir que a SIP seja enxaguada completamente. Conclua ao empurrar a água no tubo.
18. Desconecte a seringa da linha transparente (esvaziamento).
19. Desconecte a linha azul (solução de Sheath) da linha vermelha (descarte).
20. Reconecte as três linhas aos conectores no chassi ao girar cada conector aproximadamente 1/8 de volta no sentido horário e ouvir um clique de encaixe.

As informações técnicas apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 6: Maintenance

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

EXERCÍCIOS 6

1. Quando os procedimentos listados abaixo são/devem ser realizados?

SIP Clean: _____

Backflush: _____

Clean Fluidics: _____

Limpeza dos reservatórios de fluídos: _____

Substituição dos filtros (dos reservatórios e do filtro em linha): _____

_____

_____

Substituição das tubulações: _____

2. Como é realizada a limpeza dos reservatórios de fluídos?

_____

_____

_____

_____

3. Marque verdadeiro ou falso para as afirmações abaixo.

(__) O FACSVia sempre executa um ciclo de limpeza ao final da rotina.

(__) Para realizar a SIP Clean é necessário ter 1 tubo com FACSClean e 1 tubo com água destilada.

(__) O FACSVia exibe uma mensagem quando é necessário substituir as tubulações da bomba peristáltica.

(__) O filtro em linha deve ficar seco quando desligamos o FACSVia.

(__) O FACSVia não deve liberar solução pela SIP quando realizar o Backflush.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

ETAPAS IMPORTANTES PARA GARANTIR A QUALIDADE NO LABORATÓRIO

Realizar o Controle da Qualidade (QC)

É o processo de monitoramento e registro de resultados da execução das atividades de qualidade para avaliar o desempenho e recomendar as mudanças necessárias.

Realizar a Garantia da Qualidade (QA)

É o processo de auditoria dos requisitos de qualidade e dos resultados das medições de controle de qualidade para garantir que sejam usados os padrões de qualidade e definições operacionais apropriados. Realizar a garantia da qualidade é um processo de execução que usa dados criados durante o processo Realizar o Controle de Qualidade (QC).

Triagem das Amostras

É necessário que as amostras recebidas pelo laboratório sejam triadas antes de serem processadas. As amostras que não se apresentarem dentro dos padrões de normalidade, devem ser DESCARTADAS, salvo sob orientação clínica. Uma nova amostra deverá, então, ser solicitada, para nova tentativa de análise. Amostras hemolisadas, com fibrina ou com coágulos não devem ser processadas. O processo de hemólise pode causar o rompimento de outras células além das hemácias e não temos como descobrir quais células foram rompidas. A análise desta amostra pode gerar resultados falsos. Coágulos e fibrinas podem causar o entupimento do citômetro e também prejudicam a marcação homogênea das células. As amostras ictéricas e as lipêmicas podem ser preparadas e adquiridas no citômetro. Entretanto, recomendamos que as amostras sejam adquiridas em RUN/LO em vez de RUN/HI e os resultados devem ser analisados com bastante cautela pois a bilirrubina e os quilomícrons prejudicam a dispersão de luz e geram resultados errados.

Checklist da triagem

- ✓ Verificar se a amostra está devidamente identificada.
- ✓ Verificar se a requisição médica confere com a identificação do paciente no tubo e se a amostra foi colhida com EDTA.
- ✓ Verificar se o volume de sangue colhido é o especificado.
- ✓ Verificar a presença de lipemia, icterícia, hemólise e coágulos.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Preparo das amostras:

As amostras devem ser preparadas em até 48 horas após a coleta e devem ser mantidas em temperatura ambiente (20 a 25°C). Após preparadas, as amostras podem ser lidas em até 24 horas, **desde que mantidas no escuro e em temperatura ambiente (20 a 25°C)**.

Armazenamento dos reagentes:

Os reagentes devem ser armazenados de acordo com as instruções contidas nas embalagens.

- ✓ BD CS&T: geladeira (2°C a 8°C).
- ✓ Tubos Trucount: geladeira (2°C a 8°C) ou temperatura ambiente (20°C a 25°C).
- ✓ Multitest: geladeira (2°C a 8°C).
- ✓ BD Trucount Control: geladeira (2°C a 8°C).
- ✓ Solução de lise: geladeira (2°C a 8°C) ou temperatura ambiente (20 a 25°C).
- ✓ BD Sheath Additive: temperatura ambiente (20°C a 25°C).
- ✓ BD Detergent Solution Concentrate: temperatura ambiente (20 a 25°C).
- ✓ BD FACSClean Solution: temperatura ambiente ou geladeira (2°C a 30°C).
- ✓ Água destilada: temperatura ambiente (20°C a 25°C).

Reagente	Temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)	Geladeira (2 °C a 8 °C)	Temperatura ambiente ou geladeira (2 °C a 30 °C)	Freezer (-20 °C)
BD CS&T		X		
Tubos TruCOUNT	X	X		
Multitest		X		
BD TruCOUNT Controls		X		
BD FACS Lysing Solution	X	X		
BD Sheath Additive	X			
BD Detergent Solution Concentrate	X			
BD FACSClean Solution			X	
Água destilada	X			

OBSERVAÇÃO: A sala de preparo e a geladeira de armazenamento dos reagentes devem ter temperaturas controladas por termômetros. É necessário ter uma tabela de verificação diária destas temperaturas.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Preparo das Soluções:

Prepare as soluções sempre com água destilada. Respeite as concentrações estipuladas nas bulas e nunca utilize reagentes vencidos. A solução de lise deve ser dilúida em água destilada na proporção 1:10 e, após a diluição, deve ser utilizada por, no máximo, 7 dias. Além disso, após diluída a BD Detergent Solution deve ser utilizada em até duas semanas.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

PROBLEMAS E SOLUÇÕES

Solução de problemas de hardware:

1. **O citômetro e/ou o computador não ligam**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Fonte de alimentação desconectada	Certifique-se de que as fontes e os cabos de alimentação estejam conectados em uma tomada adequada.
Mau funcionamento da tomada elétrica	Verifique a tomada para garantir que ela esteja funcionando corretamente.

2. **As luzes de energia e do indicador de eventos piscam na inicialização**
    a. **As luzes de energia e do indicador de eventos piscam ao mesmo tempo.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Tanque de descarte cheio	Desligue a alimentação elétrica do citômetro. Esvazie o tanque de descarte e reinicie o citômetro.

3. **Mensagem "Extra startup time needed due to cleaning or improper shutdown" (Tempo extra de inicialização necessário devido a limpeza ou desligamento incorretos)**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Um ciclo de limpeza estendida da célula de fluxo foi executado. Erro do sistema de fluidos durante o desligamento. Instrumento desligado à força. Por exemplo, durante uma falta de energia.	Permita a execução da inicialização estendida. Esse processo levará aproximadamente 25 minutos.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

4. Porta USB não ativa ou conexão perdida

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Uma porta USB no mesmo hub que o citômetro está sendo usado	Não use uma porta USB no mesmo hub que o citômetro. Por exemplo, use as portas USB na parte frontal do computador para conectar unidades flash.
	Se a porta USB não estiver no mesmo hub que o citômetro, desconecte a unidade, aguarde 5 segundos e conecte-a novamente. Se ainda assim não funcionar, reinicie o computador.

5. Vazamento de fluido sob o compartimento de armazenamento

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Vazamento no filtro de solução de Sheath em linha	Verifique as travas Luer em ambas as extremidades do filtro para garantir que elas estejam apertadas. Se o filtro estiver amarelado ou a quantidade de fluido no filtro for inferior a 50%, substitua-o imediatamente. O filtro deve estar submergido no fluido.
Tubulação da bomba peristáltica não instalada corretamente	Verifique a tubulação da bomba peristáltica em ambas as bombas para garantir que elas estejam ligadas adequadamente aos conectores Luer.

6. A luz de status exibe uma mensagem informando que o recipiente de descarte ou de solução de Sheath está vazio, mas ele não está

Causas possíveis	Soluções recomendadas
As linhas de detecção do tanque de fluido contêm fluido	Esvazie as linhas de detecção do tanque de fluido.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

7. Mensagem "Your print job failed" (O trabalho de impressão falhou)

Causas possíveis	Soluções recomendadas
A impressora não está conectada ou está desligada	Certifique-se de que uma impressora esteja conectada, localmente ou via rede, e ligada.
Rede inoperante	Se a impressora estiver conectada à rede, certifique-se de que ela esteja funcionando normalmente.

8. Erros de falha de hardware

Se um erro de hardware ocorrer, clique em Close this window (Fechar esta janela) e siga as etapas listadas. Um relatório laboratorial não será gerado para a amostra.

Mensagem	Soluções recomendadas
The cytometer stopped because a Fluidic Stability Error occurred. (O citômetro parou devido a um erro de estabilidade fluídica.)	1. Verifique os níveis de fluido nos tanques de Soução de Sheath, detergente e BD FACSClean. 2. Verifique os clipes retentores nas bombas de fluido para garantir que elas estejam instaladas corretamente. 3. Faça uma retrolavagem, seguida por uma limpeza da SIP. 4. Verifique o desempenho do sistema ao executar o CQ do instrumento. 5. Se estiver processando uma amostra, verifique o tubo de amostra para garantir a amostra adequada. Em seguida, readquira a amostra. 6. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Mensagem	Soluções recomendadas
The cytometer stopped because a Red/Blue Laser Error occurred. (O citômetro parou devido a um erro de laser vermelho/azul.)	1. Verifique o desempenho do sistema ao executar o CQ do instrumento. 2. Readquira a amostra. 3. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.
The cytometer stopped because a Signal Processing Error occurred. (O citômetro parou devido a um erro de aquisição de sinal.)	1. Readquira a amostra. 2. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.
The cytometer stopped because an Electronic System Error occurred. (O citômetro parou devido a um erro do sistema eletrônico.)	Entre em contato com o Suporte Técnico da BD.
The cytometer stopped because a USB Connection Error occurred. (O citômetro parou devido a um erro de conexão USB.)	1. Certifique-se de que o cabo USB esteja conectado entre o citômetro e o computador. 2. Se necessário, reinicie o software. 3. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Mensagem	Soluções recomendadas
A Fluidics System Error was detected. (Um erro do sistema de fluidos foi detectado.)	Se o filtro de solução de Sheath em linha ou a tubulação da bomba peristáltica foram substituídos, essa mensagem é normal. 1. Execute dois ou três ciclos de retrolavagem. 2. Desligue o citômetro e, em seguida, reinicie-o. 3. Se o erro surgir novamente, reinicie o citômetro uma segunda vez. 4. Se o problema persistir após dois ciclos de desligamento e inicialização, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.
	Se o filtro de solução de Sheath em linha não acabou de ser trocado: 1. Verifique os tanques de fluido — encha os tanques de solução de Sheath e limpeza e/ou esvazie o tanque de descarte. 2. Verifique os tubos de BD FACSClean (círculo) e água deionizada (triângulo) na bandeja do Loader, se estiver usando um Loader, para garantir que eles contenham fluido. 3. Ao adquirir amostras, certifique-se de que haja fluido no tubo de amostra. 4. Verifique as conexões para os tanques de fluido, filtro e bombas. 5. Desligue o citômetro e, em seguida, reinicie-o. 6. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Solução de problemas de software:

1. **O ensaio não aparece no menu Test (Teste)**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Arquivo de ensaio ausente da pasta testDefinitions ou o arquivo está corrompido	Verifique a pasta Program Files\BD Accuri\BD FACSVia Clinical Software\clinical\testDefinitions. Se o arquivo de ensaio não estiver presente, reinstale o ensaio. Se o arquivo de ensaio estiver presente, apague-o e reinstale-o. Reinicie o software.

2. **O software trava na inicialização e não consegue ser executado**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Software iniciando lentamente	O software necessita de mais tempo para iniciar. Dê ao aplicativo tempo para iniciar.
Unidade USB conectada no mesmo hub que o citômetro, interrompendo a comunicação	Não use uma porta USB no mesmo hub que o citômetro. Por exemplo, use as portas USB na parte frontal do computador para conectar unidades flash externas. • Desconecte a unidade flash. • Desconecte o cabo USB entre o citômetro e o computador e, em seguida, reconecte-o.
Interferência do processo javaw.exe	Use o gerenciador de tarefas do Windows para encerrar o processo javaw.exe 1. Pressione Ctrl + Alt + Delete (Excluir). 2. Clique em Start Task Manager (Iniciar Gerenciador de Tarefas). 3. Clique na guia Processes (Processos). 4. Selecione javaw.exe e clique em End Process (Encerrar Processo). Se ainda assim o processo não terminar, desconecte o cabo USB do citômetro e conecte-o novamente.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

3. Software não respondendo

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Unidade USB conectada no mesmo hub que o citômetro, interrompendo a comunicação	Não use uma porta USB no mesmo hub que o citômetro. Por exemplo, use as portas USB na parte frontal do computador para conectar unidades flash externas. • Desconecte a unidade flash. • Desconecte qualquer uma das extremidades do cabo USB entre o citômetro e o computador e, em seguida, reconecte-o.
Interferência do processo javaw.exe	Use o gerenciador de tarefas do Windows para encerrar o processo javaw.exe 1. Pressione **Ctrl** + **Alt** + **Delete** (Excluir). 2. Clique em **Start Task Manager** (Iniciar Gerenciador de Tarefas). 3. Clique na guia **Processes** (Processos). 4. Selecione **javaw.exe** e clique em **End Process** (Encerrar Processo). Se ainda assim o processo não terminar, desconecte o cabo USB do citômetro e conecte-o novamente.
Cabo USB desconectado	Certifique-se de que o cabo USB entre o citômetro e a estação de trabalho esteja conectado.

4. A luz de status não acende

Causas possíveis	Soluções recomendadas
O cabo USB não está conectando corretamente o citômetro ao computador	1. Certifique-se de que o cabo USB esteja conectado corretamente entre o citômetro e o computador. Poderá demorar alguns segundos para que a porta reconheça o citômetro. 2. Se necessário, reinicie o computador.
	Mova o cabo USB para uma porta diferente no computador.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

5. **O software aparenta encerrar, mas continua a executar em segundo plano**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Interferência do processo javaw.exe	Use o gerenciador de tarefas do Windows para encerrar o processo javaw.exe 1. Pressione **Ctrl** + **Alt** + **Delete** (Excluir). 2. Clique em **Start Task Manager** (Iniciar Gerenciador de Tarefas). 3. Clique na guia **Processes** (Processos). 4. Selecione **javaw.exe** e clique em **End Process** (Encerrar Processo). Se ainda assim o processo não terminar, desconecte o cabo USB do citômetro e conecte-o novamente.

Solução de problemas de aquisição:

1. **Os dados não estão de acordo com o esperado**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
A amostra precisa ser reiniciada	Cancele e reinicie a aquisição. Opcionalmente, adquira a amostra novamente na conclusão da aquisição.
Sistema de fluidos sujo ou entupido	1. Certifique-se de que a solução de Sheath seja filtrada com um filtro de 0,2 µm. 2. Realize uma retrolavagem. 3. Realize uma limpeza da SIP.
Bolhas de ar na célula de fluxo ou no filtro de solução de Sheath em linha	1. Realize uma retrolavagem. 2. Realize uma limpeza da SIP.

2. **Um ponto de exclamação vermelho surge próximo ao número da amostra na lista de trabalho**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Erro de falha de hardware	Se um erro de falha de hardware ocorrer durante a aquisição, os dados da amostra não estarão disponíveis para análise e um relatório laboratorial não será gerado. Readquira a amostra.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

3. A taxa de eventos cai durante a aquisição

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Células sedimentadas na parte inferior do tubo	Pause a aquisição e misture o tubo. Se estiver usando um Loader, ejete o rack e misture os tubos manualmente.
Sistema de fluidos sujo ou entupido	1. Realize uma retrolavagem. 2. Realize uma limpeza da SIP. 3. Se o problema persistir, execute um ciclo de limpeza estendida da célula de fluxo.

4. As bombas estão funcionando normalmente, mas os dados não estão sendo adquiridos

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Solução de Sheath baixa demais e/ou nível de descarte alto demais	Verifique os níveis nos tanques de solução de Sheath e descarte.
Linhas de fluido dobradas	Verifique todas as linhas de fluidos, nos tanques, conectores e bombas peristálticas, em busca de dobras.
SIP entupida	1. Realize uma retrolavagem. 2. Realize uma limpeza da SIP. 3. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.
Tubulação da bomba peristáltica não conectada corretamente	Certifique-se de que a tubulação e o clipe retentor da bomba peristáltica estejam conectados corretamente.

5. As bombas trabalham sem parar

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Ar no filtro de solução de Sheath em linha	• Se a quantidade de fluido no filtro for inferior a 50%, substitua-o. • Se o filtro contiver uma bolsa de ar, faça uma retrolavagem e, em seguida, uma limpeza da SIP.
Linhas de fluido entupidas	1. Realize uma retrolavagem. 2. Realize uma limpeza da SIP.
Tubulação da bomba peristáltica danificada	Substitua a tubulação da bomba peristáltica.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

6. Quantidade excessiva de debri

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Threshold ajustado manualmente e setado muito baixo	Aumente o Threshold. Tome cuidado para não eliminar os linfócitos.
Amostras marcadas há muito tempo	Verifique a estabilidade da amostra.
Mal preparo da amostra	Verifique o procedimento de marcação.

7. Populações distorcidas ou com padrões inesperados

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Célula de fluxo suja, entupida ou contém bolhas de ar	1. Realize uma retrolavagem. 2. Realize uma limpeza da SIP.
Bolhas de ar na célula de fluxo ou no filtro de solução de sheath em linha	1. Realize uma retrolavagem. 2. Realize uma limpeza da SIP.
Compensação ajustada manualmente e incorretamente	Não recomendamos ajustar os valores de compensação. 1. Selecione I**nstrument > Set Color Compensation**. 2. Clique **Reset to BD Default**.
Amostra lida estava incorreta	Assegure-se de que a amostra correta foi lida.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Mensagens de erro:

As mensagens abaixo podem ser apresentadas na guia Review quando ocorrerem problemas na aquisição.

1. **Did not acquire 2,700 events in (Lymphs or T-Cells) region. Acquisition stopped. Acquisition timed out.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Preparo inadequada da amostra	Verifique o protocolo de preparo da amsotra.
Gate de linfócitos ou células T não abrangendo as populações de interesse	Ajuste os gates para incluir as populações.

2. **Did not acquire 600 events in Beads region**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Amostra muito concentrada	Se houver muitas células na amostra, o tempo de execução será curto e um número insuficiente de Beads será adquirido. Dilua, marque e adquira a amostra a amostra novamente.
Pellet de Beads ausente ou danificado	Se o tempo de execução for normal (1-2 minutos), pode haver um problema com o pellet de Beads. Repita a marcação com um novo tubo BD Trucount. Verifique para garantir que o pellet está intacto.

3. **Acquisition aborted by operator.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Aquisição abortada	Aquisição pode não ter sido concluída. Os dados são questionáveis. Reacquira a amostra.

4. **Algorithm error on (Lymphs/T-cells/Beads/Quadrant) gate. Data cannot be processed.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
O software não pode colocar regiões	Ver solução abaixo. Pode não ser possível definir as regiões para essa amostra. Observe que as regiões são deixadas nos locais padrão, portanto, os resultados não devem ser considerados válidos.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

5. **(Lymphs/T-cells/Beads/Quadrant) gate failed internal QC.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Amostra lida estava incorreta	Assegure-se de que a amostra foi marcada para o teste correto.
Preparo inadequada da amostra	Verifique o protocolo de preparo da amsotra.
Compensação ajustada manualmente e incorretamente	Não recomendamos ajustar os valores de compensação. 1. Selecione I**nstrument > Set Color Compensation**. 2. Clique **Reset to BD Default**.
Má separação das populações	Algumas amostras podem não mostrar separação adequada entre as populações. Verifique regiões e marcadores e ajuste onde for necessário. Nota: Ao ajustar uma região, certifique-se de verificar e ajustar regiões e marcadores em gráficos derivados da região ajustada.

6. **Gate was manually modified.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Gate ajustado pelo usuário	Certifique-se de que você está selecionando a população correta.

7. **Ran with failed Instrument QC.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Último Instrument QC apresentou falhas	Embora o software permita que você execute com QC com falha, assegure-se de que o QC do instrumento passe antes de executar as amostras de teste.

8. **Ran with expired CS&T bead lot.**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
BD CS&T expirado	Repita o QC do instrumento com um novo lote de BD CS&T. Consulte a IFU do Sistema BD FACSVia para obter instruções sobre como instalar um novo lote de esferas.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

9. Ran with expired Trucount bead lot.

Causas possíveis	Soluções recomendadas
BD Trucount tubes expirado	Abra um novo lote de tubos BD Trucount. Se misturar tubos BD Trucount a partir de lotes diferentes dentro da mesma lista de trabalho, certifique-se de inserir informações corretas do número de esferas BD Trucount para cada lote.

10. Threshold was manually modified.

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Threshold ajustado pelo usuário	Embora não seja normalmente necessário, ajustes no Threshold podem ser feitos. Certifique-se de que a configuração do Threshold não elimine os linfócitos.

11. Compensation was manually modified.

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Compensação ajustada pelo usuário	Embora não seja normalmente necessário, ajustes de compensação podem ser feitos. Não recomendamos ajustar os valores de compensação. 1. Selecione I**nstrument > Set Color Compensation**. 2. Clique **Reset to BD Default**.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Solução de problemas de CQ:

1. **Nenhuma esfera detectada**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Não há esferas na amostra	Certifique-se de que o tubo de amostra correto esteja sendo processado
Esferas não misturadas corretamente	• Submeta o frasco de esferas ao vortex antes de preparar a suspensão de esferas. • Submeta a suspensão de esferas ao vortex antes de executar as esferas.

2. **Resultado de reprovação do CQ**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Regiões e/ou markers não definidos corretamente	Ajuste as regiões e os markers conforme o necessário. Consulte
Esferas vencidas	Verifique a data de validade das esferas. Se necessário, realize o CQ outra vez com esferas novas.
Suspensão de esferas antiga	Uma vez preparadas, as esferas permanecem estáveis por 8 horas quando armazenadas em 2 – 8 °C e protegidas contra a luz. Após esse período, prepare uma suspensão de esferas nova.
CVs elevados causados por bolhas/detritos.	1. Certifique-se de que a solução de Sheath seja filtrada com um filtro de 0,2 µm. 2. Realize uma retrolavagem. 3. Realize uma limpeza da SIP.

3. **Mensagens de CQ**

Mensagem	Soluções recomendadas
Event count for Mid + Bright too low (Contagem de eventos para esferas de médio + alto brilho baixa demais)	• Esferas sedimentadas na parte inferior do tubo. Ressuspenda as esferas e readquira a amostra. • Certifique-se de que a região envolva a população de esferas de médio + alto brilho no gráfico FSC x SSC. Se necessário, ajuste a região.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Mensagem	Soluções recomendadas
Percentage of events for Mid + Bright too low (Percentual de eventos para esferas de médio + alto brilho baixo demais)	• Esferas sedimentadas na parte inferior do tubo. Ressuspenda as esferas e readquira a amostra. • Certifique-se de que a região envolva a população de esferas de médio + alto brilho no gráfico FSC x SSC. Se necessário, ajuste a região. • A esferas não estão mais estáveis. Prepare uma nova solução de esferas.
Percentage of events in FSC/SSC/FL**1**/FL2/ FL3/FL4 Noise too low (Percentual de eventos em Ruído FSC/SSC/FL1/FL2/ FL3/FL4 baixo de mais)	Execute as esferas novamente. Se a mensagem surgir novamente, prepare uma nova suspensão de esferas. Não ajuste os gates de ruído. Se o problema persistir, entre em contato com o Suporte Técnico da BD.
Event count for FL1/ FL2/FL3/FL4 Bright too low (Contagem de eventos em Brilhantes FL1/FL2/ FL3/FL4 baixa demais)	Certifique-se de que o pico de esferas no gráfico correspondente esteja localizado entre os markers. Se necessário, ajuste o marker. Se a mensagem continuar a ser mostrada, prepare uma nova suspensão de esferas.
Percentage of events in FL1/FL2/FL3/FL4 Bright too low (Percentual de eventos em Brilhantes FL1/FL2/FL3/FL4 baixo demais)	Certifique-se de que o pico de esferas no gráfico correspondente esteja localizado entre os markers. Se necessário, ajuste o marker. Se a mensagem continuar a ser mostrada, prepare uma nova suspensão de esferas.

4. A mediana de esferas de alto brilho e/ou o %rCV se deslocam com o tempo

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Tubulação da bomba peristáltica desgastada	Substitua a tubulação da bomba peristáltica.

As informações técnicas apresentadas nesta sessão constam no manual do usuário “BD FACSVia System Intructions for use” no capítulo 8: Troubleshooting

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Solução de problemas nas amostras e controles:

Embora a fase analítica da quantificação de CD4/CD8 seja a fase onde a análise automática dos dados é feita pelo BD FACSVia Clinical Software, 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 Multitest™, dos tubos TruCOUNT e do TruCOUNT Controls foram inseridos no software corretamente. Além disso, o número de *beads* por *pellet* do tubo trucount e a média e desvio padrão das *beads* do trucount control 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 indentificar 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.

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 baseda 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 basedos na dispersão de luz, como por exemplo, os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Amostras com lipêmia intensa induzem uma perda na resolução dos parâmetros e consequentemente o que observamos é a compressão das células no eixo de SSC (granulosidade) dificultando a separação das populações celulares em linfócitos, monócitos e granulócitos.

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 cometário 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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

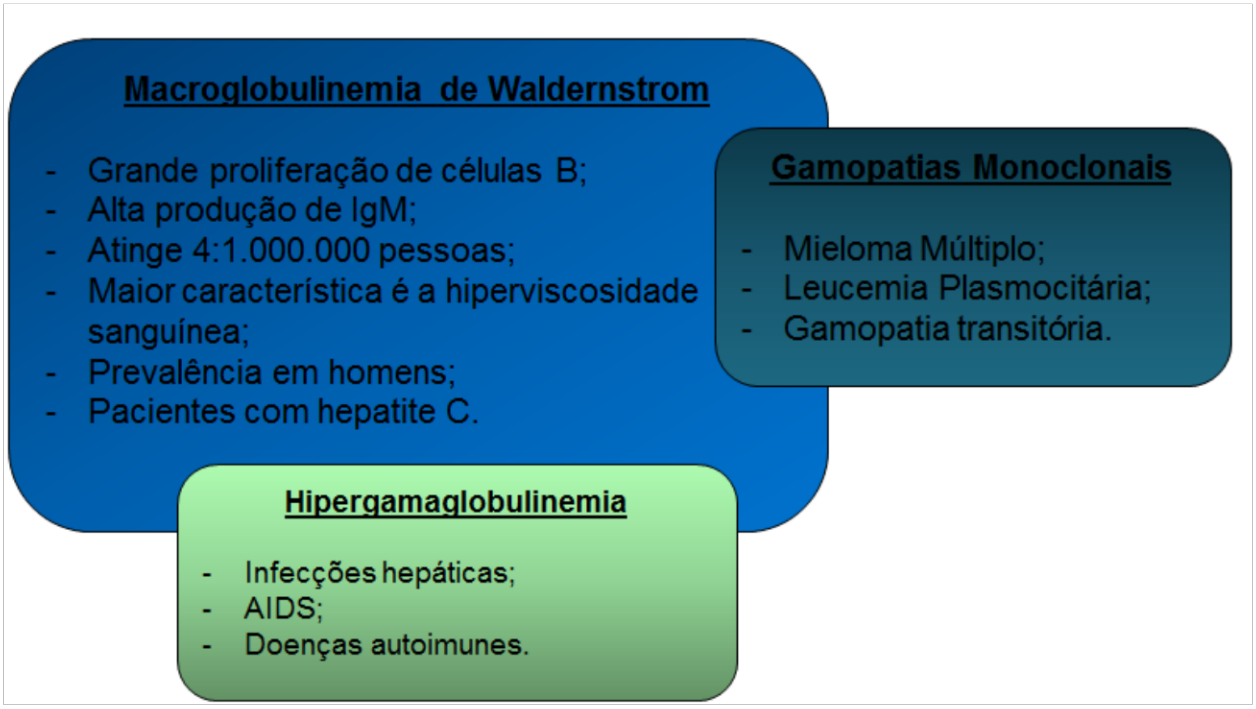
Aglutininas

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 frequencia 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 sim formando imunocomplexos, que dificultam a ligação Ag-Ac (Sarmiento *et al*., 2013).

✓ Macroglobulinemia de Walderstron, Crioglobulinemias, etc.



Tal assunto merece foco durante o treinamento de quantificação de CD4/CD8 devido ao fato de a presença dessas glubulinas influenciar, de maneira negativa, os resultados gerados pela citometria de fluxo. A

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

presença de auto-anticorpos no plasma pode mascarar a identificação dos marcadores de superfície pelo anticorpos utilizados na metodologia, devido a formação dos imunicomplexos que atrapalham a ligação Ag/Ac.

Inicialmente o problema pode ser solucionado com a incubação da amostra *in natura* em banho-maria a 37°C por 5 a 15 minutos. Porém, em alguns casos tal procedimento não é suficiente e se faz necessário dar inicio a um procedimento de lavegem da amostra, assim como o realizado para amostra com lipêmia intensa:

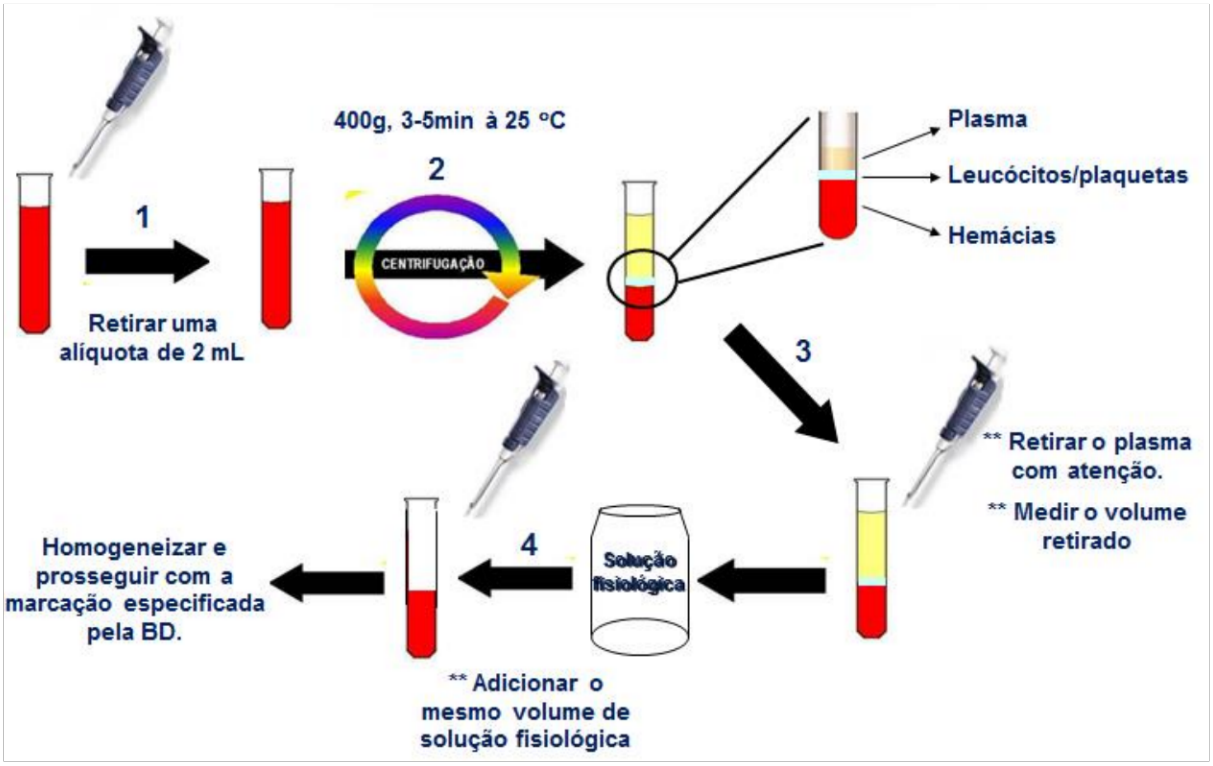
Protocolo de centrifugação e substituição do volume plasmático

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 25º C);
4. Após centrifugação retirar o plasma cuidadosamente para que a camada leucocitária seja mantida intácta (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 ficiológica;
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, FACSVia 4 cores.

Quando o procedimento acima é adotado, nossa ressalva é que no laudo médico se acrescente o cometário 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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

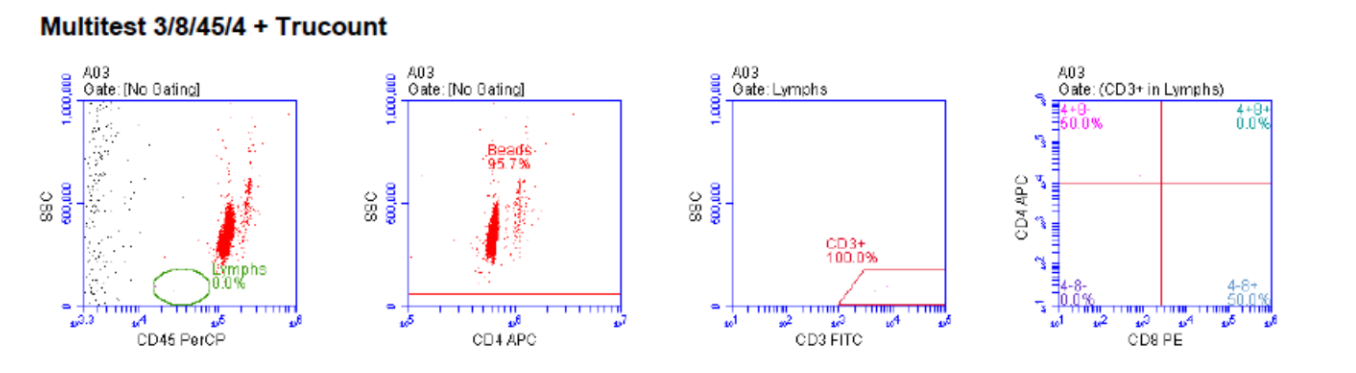
Protocolo de remoção do plasma



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

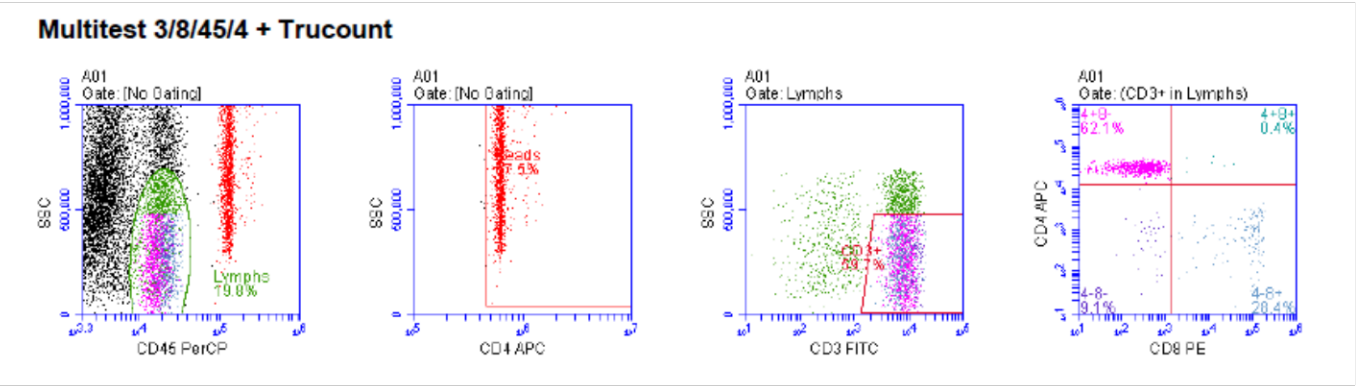
Ausência de monoclonal

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.



Lise dos eritrócitos

Este gráfico é representativo de uma amostra preparada com solução de lise diluída em solução de Sheath (o certo é diluir a solução de lise em água destilada).



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

EXERCÍCIOS 7

1. Em que temperatura devem ser armazenados os reagentes abaixo?

a. CS&T _____
b. Multitest _____
c. Tubos Trucount _____
d. Trucount Control _____
e. FACSLysing _____
f. Sheath additive _____
g. Detergent Solution _____
h. BD FACSClean _____

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

a. amostra lipêmica:

_____

b. amostra com fibrina:

_____

c. amostra ictérica:

_____

d. amostra hemolisada:

_____

e. amostra com coágulos:

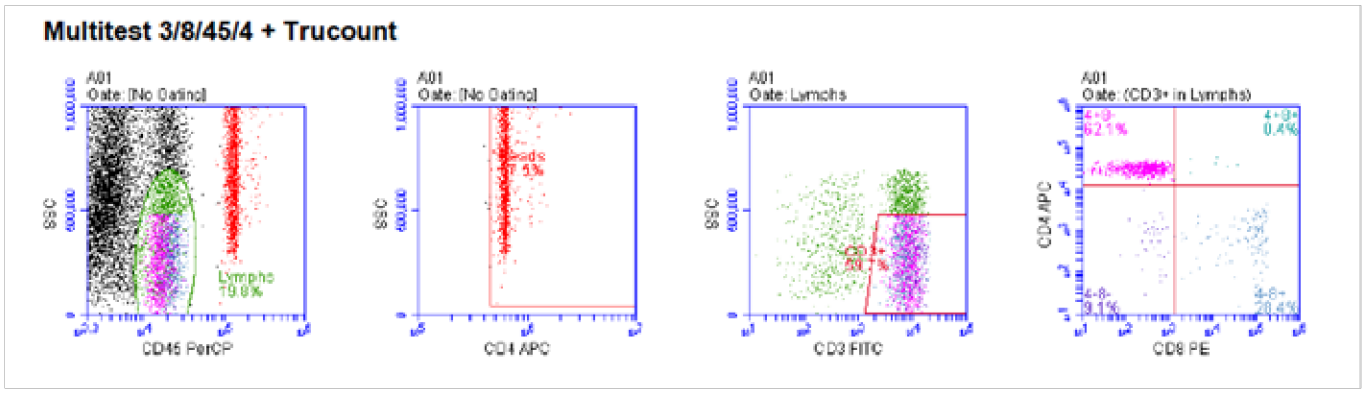
_____

3. Descreva o protocolo de lavagem da amostra que pode ser realizado quando não conseguimos analisar uma amostra devido à substâncias presentes no plasma

_____
_____
_____

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

4. Após adquirir as primeiras amostras da rotina de exames foi notado que todas estavam alteradas, não sendo possível identificar os linfócitos no primeiro gráfico do relatório. Indique qual deve ser o problema e como ele pode ser resolvido.



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 BD FACSClean.
- A desinfecção do reservatório de esgoto do equipamento deve ser realizada com a adição de hipoclorito puro (400ml). Antes de esvaziar o reservatório, deixe-o em repouso por pelo menos 30 minutos após o término da rotina. Caso seja necessário, utilize o reservatório sobressalente.
- 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 pérfuro-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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

GERENCIAMENTO DE ARQUIVOS

O sistema BD FACSVia gera os arquivos a seguir.

Arquivo	Descrição
FCS	Arquivos FCS 3.1 não são salvos por padrão, mas podem ser exportados a qualquer momento após a aquisição
Workspace	Os arquivos Workspace contêm todas as informações inseridas na guia Acquire (Aquisição), incluindo informações de amostras, informações de BD Trucount Bead e informações de laboratório, bem como os dados de teste.
Lab reports	Um lab report é salvo automaticamente para cada amostra. Os lab reports ***ID_teste_aaaammdd_hhmmss.pdf.***
CSV de resultados	Os arquivos CSV são salvos somente quando você opta por salvá-los nas preferências de locais de salvamento. Um único arquivo CSV é salvo para cada amostra e esse arquivo deve ser exportado ao ***SISCEL***
Relatórios de CQ	Um relatório de CQ é salvo para cada teste de CQ do instrumento.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

EXPORTAÇÃO DE RESULTADOS PARA O SISCEL

Para se realizar a exportação dos dados:

1. Busque os arquivos de exportação no diretório:

2. Com um pendrive posicionado no computador, copie os arquivos 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).

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

MATERIAL ADICIONAL

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 preparo 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.

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

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

7. Procedimento

A pipetagem reversa é a técnica recomendada para pipetar soluções viscosas, que possuem tendencia 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 ponteiras 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 contend 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.*

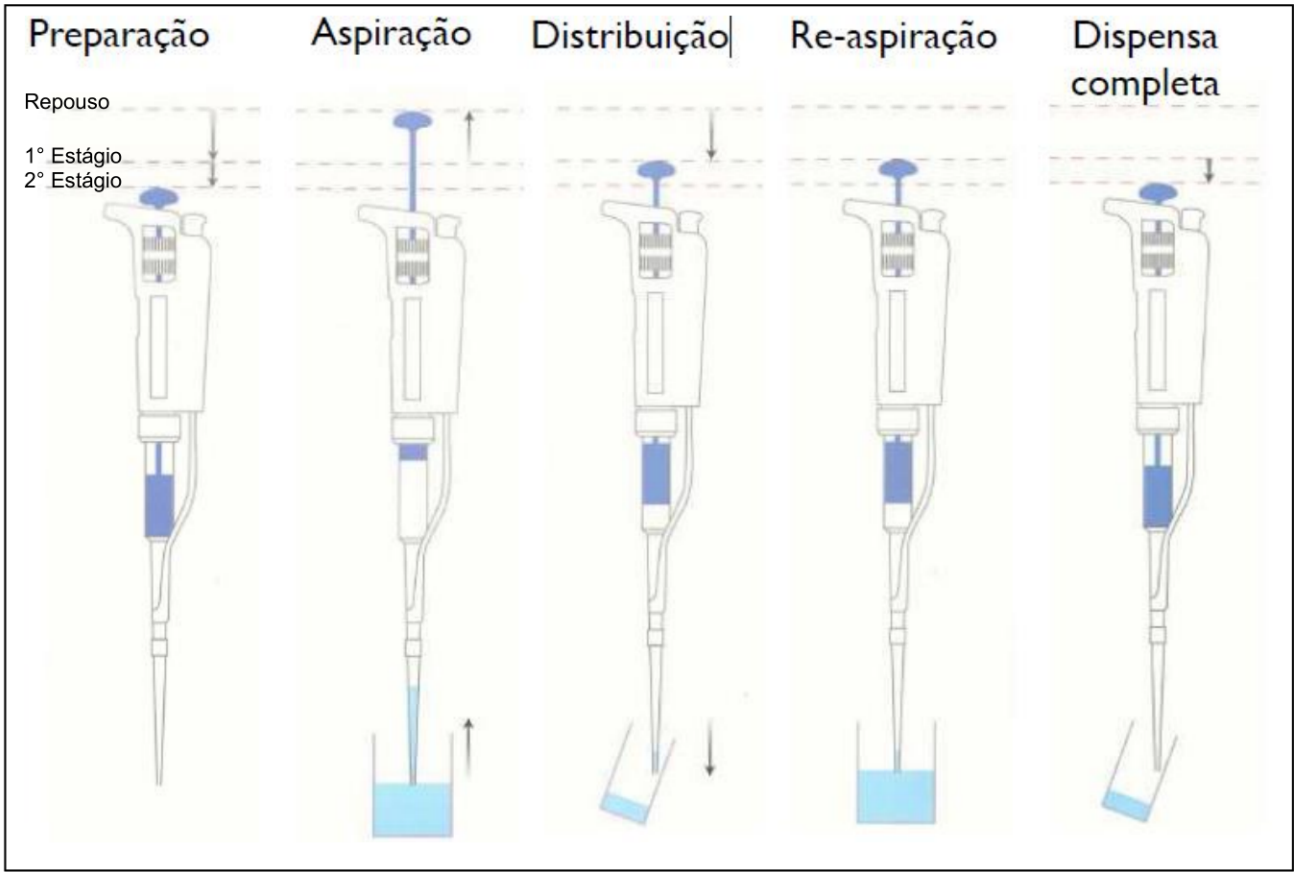
7.1.7. Dispense o sangue em um tubo vazio empurrando gentilmente o botão de aspiração/dispensa até o primeiro estágio. Segure o botão nessa posição por alguns segundos. O sangue que restou na ponteira não deve ser dispensado.

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 fluído. O líquido pode entrar no sistema mecânico da pipeta e danificá-la.*

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Veja o resumo do procedimento na figura abaixo:



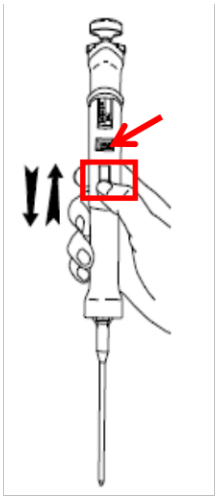
© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Utilização da pipeta de repetição

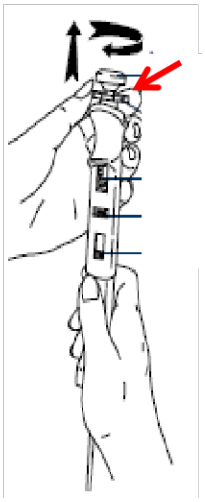
A pipeta de repetição é classificada como pipeta de deslocamento positivo onde a pipeta não te contato direto com a amostra a ser pipetada, pois o contato é via o pistão que existe na pipeta. Para essa pipeta serão utilizadas seringas de capacidade para 12,5 mL com volume de dispensação de 100µL a 1250µL.

Essa pipeta deverá ser utilizada no laboratorio 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. Selecionar a seringa a ser utilizada - **12,5 mL.**

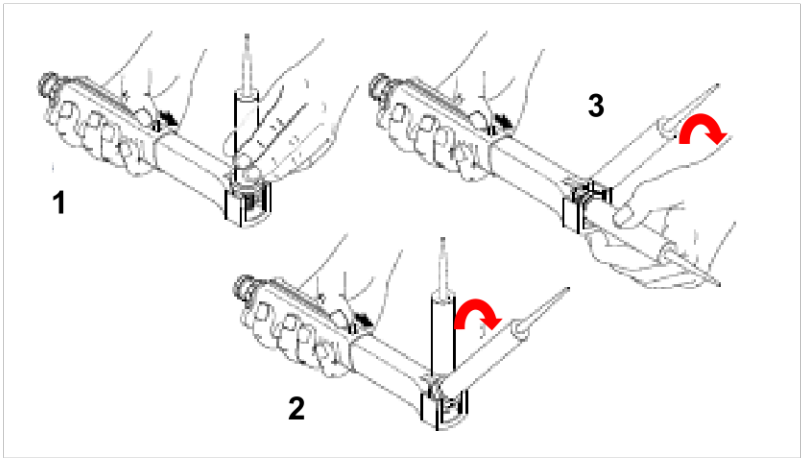


2. Seleccionar o volume: destrave a peça preta empurando para cima e gire até atingir o volume desejado - 450µL.



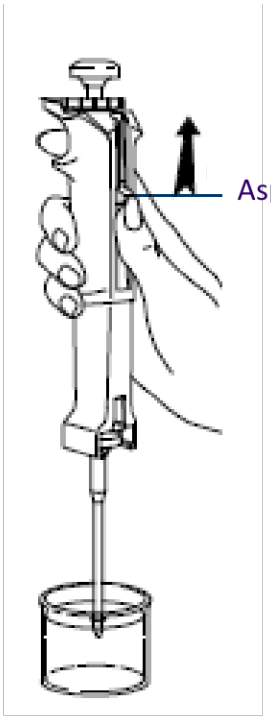
© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

3. Encaixe a seringa na ponteira como mostrado na figura abaixo:



4. Para aspirar prossiga como ilustrado abaixo.

Essa pipeta não possui segundo estágio de dispensa.



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

DICAS DE PIPETAGEM

Uma boa pipetagem é resultado da intregação 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. Umideça 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 significante 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 temperature 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 liquído.

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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 primerio 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 descanço

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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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 conteudo liquido dentro;
7. Virar a pipeta de cabeça para baixo;
8. Tentar ajustar um volume maior que o especificado na pipeta.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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)

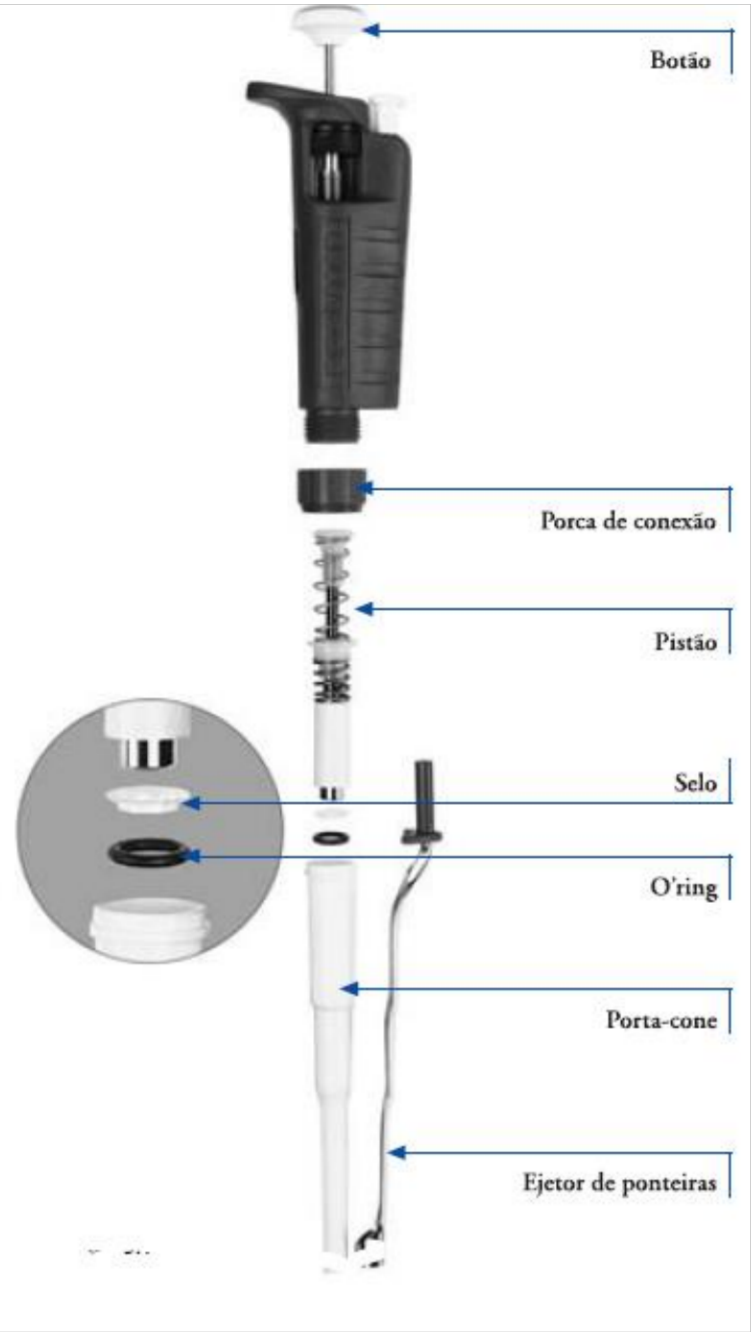
É necessário que se desmonte a pipeta para fazer a limpeza (deve-se utilizar luvas quando houver risco de contaminação). Antes de desmontar a pipeta, coloque-a no volume máximo de aspiração. Nunca ultrapasse esse volume, pois isso descalibra a pipeta.

1. Retire o ejetor de ponteiras 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. Freqüentemente 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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

Figura 1: Pipeta desmontada.



© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

B. LIMPEZA

1. Coloque o porta-cone, o conjunto do pistão, o ejetor de ponteiras, 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°C ± 3°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°C ± 3°C (não ultrapasse esta temperatura), durante no máximo 2 horas).

Se não tive 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 apresentarem pouca sujeira e concentração de 8% para limpeza de pipetas que apresentarem 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.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

REFERÊNCIAS

I- Sites

BD Biosciences Immunocytometry Systems	www.bdbiosciences.com/ immunocytometry_systems
Case Studies in Clinical Flow Cytometry	http://www.flowcases.org/website/ index.cfm
Dana-Farber Core Facility	http://research.dfci.harvard.edu/ flowlab/
BD Biosciences Pharmingen	http://www.bdbiosciences.com/pharmingen/
Stanford Shared FACS Facility	http://facs.stanford.edu/

Referências

1. MURPHY, Kenneth et al. Imunobiologia de Janeway. 7. ed. Porto Alegre: Artmed®, 2010. 899 p.
2. Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 7ª ed. 2012.
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. Kutok JL, Roma AO, Lemire SJ, et al. Four-color flow cytometric immunophenotypic determination of peripheral blood CD4+ lymphocyte counts. A comparison of validity and cost-effectiveness with a two-color method. American Journal of Clinical Pathology. 1998; 110: 465-470.
5. 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.
6. 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.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da Infecção pelo HIV em Adultos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das Infecções Sexualmente Transmissíveis, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. – Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 412 p.: il. ISBN 978-85-334-2640-5. Disponível em: < http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos> Acesso em: maio de 2022.
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: maio de 2022.

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

9. 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.
10. Analitica.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: maio de 2022.
11. 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: maio de 2022.

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."

Código para rastreio no sistema Veeva Vault -BD-46696

© 2018 BD. All rights reserved. Unless otherwise noted, BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.