

# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

## BD FACSLyric™

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 FACSLyric™.
- 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



Galdino, Nayane  
Niquirilo, Andrea  
Reis, Edione Cristina  
Santillo, Bruna  
de Oliveira, Vivian  
Castro, Iris  
Reis, Denise

**Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+ – Módulo Básico -  
Plataforma BD FACSLyric™**- São Paulo, 2022. 139 f.

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



# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

## BD FACSLytic™ – Módulo Básico

### AGENDA

#### Treinamento Básico

Horários	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
9:00 - 10:30	Imunologia AIDS Patogênese do HIV	Preparo de amostras e controles (teoria) Prática 3: Pipetagem	Problemas e Soluções: amostras e controles	Prova Teórica
10:30 - 10:45	<i>Coffee Break</i>	<i>Coffee Break</i>	<i>Coffee Break</i>	
10:45 - 12:30	Princípios básicos da citometria de fluxo  CQ Na rotina CD4/CD8: Pré Analítica	Prática 4: Preparo de amostras e controles  Prática 5: BD FACSLytic™ clinical software e Aquisição de amostras	Garantia e CQ no laboratório  Prática 6: Limpeza de pipeta	
12:30 - 13:30	Almoço	Almoço	Almoço	Almoço
13:30 - 15:30	CQ Na rotina CD4/CD8: Pré Analítica (calibração)  Prática 1: Apresentação do equipamento  Prática 2: calibração e limpeza da probe	Interpretação dos resultados	Prática 7: Preparo de novas amostras e controles	Despedida
15:30 - 15:45	<i>Coffee Break</i>	<i>Coffee Break</i>	<i>Coffee Break</i>	
15:45 - 17:00	Prática 2: calibração e limpeza da probe  Resolução de exercícios	Problemas e Soluções: Calibração  Resolução de exercícios	Prática 8: Limpeza da probe e da célula de fluxo  Manutenções	



## **ÍNDICE**

IMUNOLOGIA.....	12
LINFÓCITOS T CD4+ .....	16
LINFÓCITOS T CD8+ .....	17
IDENTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS .....	18
POR QUE UTILIZAMOS O CD45? .....	20
MARCADORES CD3/CD4/CD8 .....	21
EXERCÍCIOS 1 .....	22
SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (Aids) .....	25
CICLO DE VIDA DO HIV .....	25
PATOGÊNESE DO HIV .....	27
QUANTIFICAÇÃO DE LTCD4+ E OBJETIVOS DO TRATAMENTO.....	29
EXERCÍCIOS 2 .....	31
PRINCÍPIOS BÁSICOS DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	32
SISTEMAS .....	35
VISUALIZAÇÃO DOS DADOS NO BD FACSLYRIC™ CLINICAL SOFTWARE.....	40
APRESENTAÇÃO DO EQUIPAMENTO .....	41
PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES E INICIALIZAÇÃO DO EQUIPAMENTO .....	42
EXERCÍCIOS 3 .....	45
CONTROLE DE QUALIDADE NA ROTINA DE QUANTIFICAÇÃO CD4/CD8 .....	46
FASE PRÉ ANALÍTICA.....	46
FASE ANALÍTICA .....	48
Controle de qualidade do equipamento/Calibração .....	48
Characterization QC (Caracterização do QC).....	48
Interpretação do Characterization QC Report (Relatório de Caracterizaçãodo QC).....	52
Performance QC (Desempenho do QC).....	53
Interpretação do Performance QC Report (Relatório do desempenho do QC).....	57
Compensação .....	58
Update reference setting (Atualizar das configurações padrões).....	58
Instalação de um novo lote de esferas.....	63
EXERCÍCIOS 4 .....	66
Preparo das amostras e controles .....	68
Preparação das amostras .....	68
Preparação dos Controles.....	69
BD FACSuite Clinical e Aquisição de amostras .....	71
Preparação da Library: .....	71
Configuração dos arquivos salvos: .....	76
Preparação da lista de trabalho: .....	80
Aquisição das amostras:.....	83



FASE PÓS-ANALÍTICA .....	87
Interpretação de resultados.....	87
Amostras .....	87
Controles .....	89
Regras de Westgard na rotina CD4/CD8 .....	91
Fluxograma das Regras de Westgard.....	92
EXERCÍCIOS 5 .....	93
LIMPEZA E MANUTENÇÃO DO EQUIPAMENTO.....	95
MANUTENÇÕES DIÁRIAS .....	95
Manutenção após aquisição e desligamento: .....	95
Preenchimento do tanque de BD FACSLytic™: .....	96
MANUTENÇÕES PERIÓDICAS.....	99
Troca do Sheath Filter (filtro de BD FACSLytic™):.....	102
MANUTENÇÕES EXTRAS.....	105
EXERCÍCIOS 6 .....	106
ETAPAS IMPORTANTES PARA GARANTIR A QUALIDADE NO LABORATÓRIO .....	107
Realizar o Controle da Qualidade (QC).....	107
Realizar a Garantia da Qualidade (QA).....	107
Triagem das Amostras .....	107
Checklist da triagem.....	108
Preparo das amostras:.....	108
Armazenamento dos reagentes: .....	108
Preparo das Soluções: .....	109
PROBLEMAS E SOLUÇÕES.....	110
Solução de problemas de hardware:.....	110
Solução de problemas de software:.....	110
Solução de problemas de aquisição: .....	110
Solução de problemas ao adquirir as beads CS&T:.....	112
Solução de problemas nas amostras e controles: .....	113
Lipemia .....	113
Aglutininas.....	114
Protocolo de centrifugação e substituição do volume plasmático .....	115
Ausência de monoclonal .....	117
Lise dos eritrócitos.....	117
EXERCÍCIOS 7 .....	119
SEGURANÇA E SAÚDE NO LABORATÓRIO .....	121
Precauções Universais.....	121
Descarte de Material Contaminado.....	121
Rotulagem Preventiva .....	122
Risco Químico.....	122



GERENCIAMENTO DE ARQUIVOS .....	123
EXPORTAÇÃO DE RESULTADOS PARA O SISCEL.....	124
MATERIAL ADICIONAL.....	125
DICAS DE PIPETAGEM.....	132
GUIA DE LIMPEZA DA PIPETMAN .....	135
REFERÊNCIAS.....	139



## GLOSSÁRIO

- **BD™ CS&T BEADS** – 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. O BD™ CS&T BEADS é utilizado nos processos de Characterization QC e Performance QC.
- **BD™ FC Beads 7-Color Kit**– Partículas (*beads* – esferas de poliestireno) marcadas com fluorocromos usadas para otimizar as definições de compensação. As BD™ FC Beads 7-Color Kit são utilizadas no processo de Update reference Settings.
- **Célula de fluxo:** Local do fluxo de amostra onde o laser incide na célula ou partícula de interesse.
- **Compensação:** procedimento realizado para eliminar a sobreposição de espectros de emissão dos fluorocromos, permitindo que cada detector identifique somente uma fluorescência específica.
- **Detectores:** responsáveis por converter o sinal luminoso em pulsos elétricos, os quais são proporcionais à quantidade de luz dispersa ou fluorescente captada pelo detector. São divididos em:
  - **Fotodiodo** - menos sensível precisa de intensidade de luz maior para gerar sinal elétrico. Detector de tamanho (FSC) 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.
- **Dot plot** – Gráfico de pontos, que representam as populações celulares no laboratory report emitido para cada amostra durante a rotina.
- **Filtros para BD FACSTFlow™:** A solução de BD FACSTFlow™ é filtrada por duas vezes, o primeiro filtro está presente no Supply-line filter holder (Suporte do filtro da linha de suprimento) e o segundo filtro está na lateral do equipamento. Estes filtros são responsáveis por filtrar o BD FACSTFlow™ antes de sua entrada no equipamento, reduzindo a quantidade de debris na solução.



- **Fluorocromos (FITC, PE, PerCP, APC)** – Partículas associadas aos anticorpos que emitem fluorescência ao entrarem em contato com o laser. No BD FACSLyric™ da Rede do Ministério, usamos FITC (isotiocianato de fluoresceína), PE (ficoeritrina), PerCP (peridinin chlorophil protein) e APC (aloficocianina).
- **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 FACSSuite™ Clinical Software** – Software clínico utilizado no BD FACSLyric™ para leitura de amostras da rotina.
- **BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC** – Reagente utilizado na rotina. Contém os anticorpos monoclonais necessários para identificação das populações celulares importantes em exames CD4/CD8: anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 e anti-CD45.
- **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 BD FACSLyric™ 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 preparação de amostras para leitura no BD FACSLyric™ que lisa hemácias.
- **SSC** - Detector do tipo fotodiodo que identifica granulidade ou complexidade das células ou partículas.



- **BD Trucount™ Control Beads** – 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 da preparação de três determinadas amostras para realização do referido controle.
- **BD Trucount™ Absolute Count Tubes** - Tubos usados para preparação de amostras da rotina que contêm *beads* de referência no fundo para realização da contagem absoluta.



## IMUNOLOGIA

A imunologia é o ramo da ciência que estuda o funcionamento e a participação do Sistema Imunológico (também chamado de Sistema Imunitário ou de Sistema Imune) tanto em condições fisiológicas relacionadas ao estado sadio, como em condições patológicas (de doenças) que promovam alterações ou distúrbios da fisiologia. O sistema imunológico (SI) é, portanto, um importante contribuinte para o processo de manutenção e restabelecimento da condição de saúde fisiológica de um organismo.

Como importante contribuinte para a compreensão do funcionamento dos organismos e, sobretudo, para os avanços da Medicina, a Imunologia historicamente 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 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 nesses 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 sangüíneos. 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 principalmente: 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. Dentre os linfócitos B, alguns 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 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 abaixo .

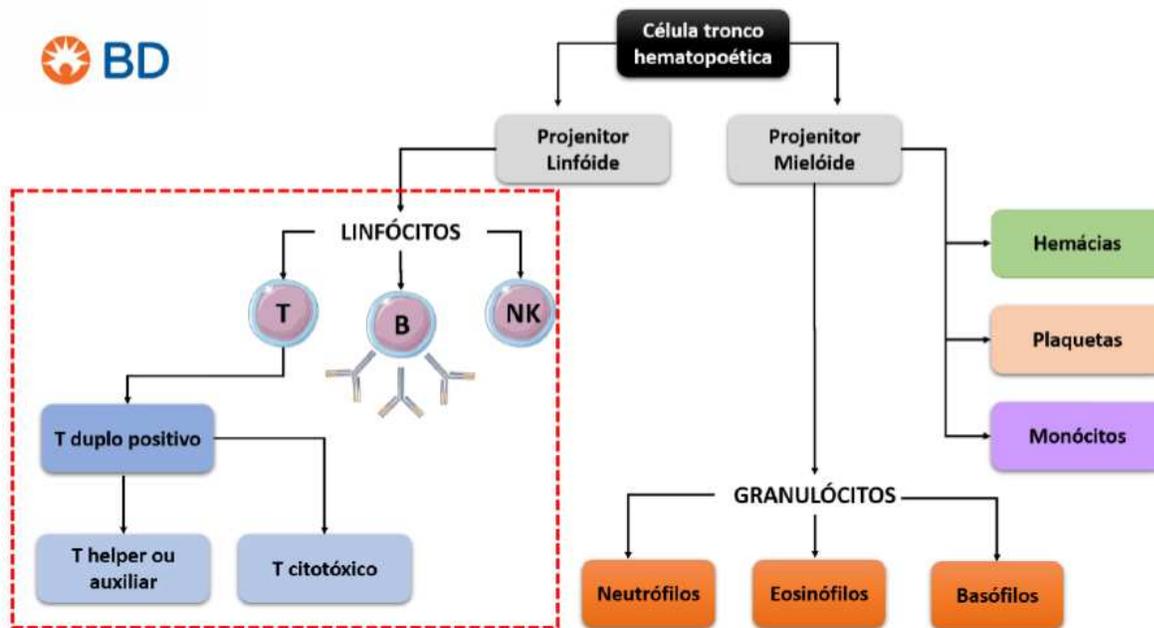


Figura 1: Origem das células do Sistema Imune.

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

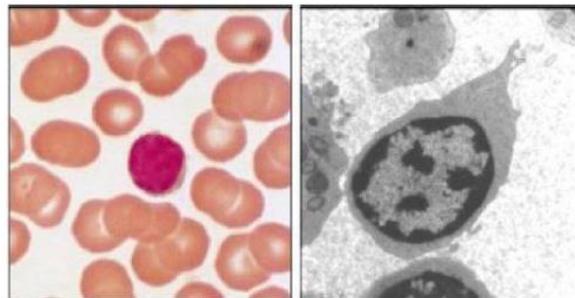
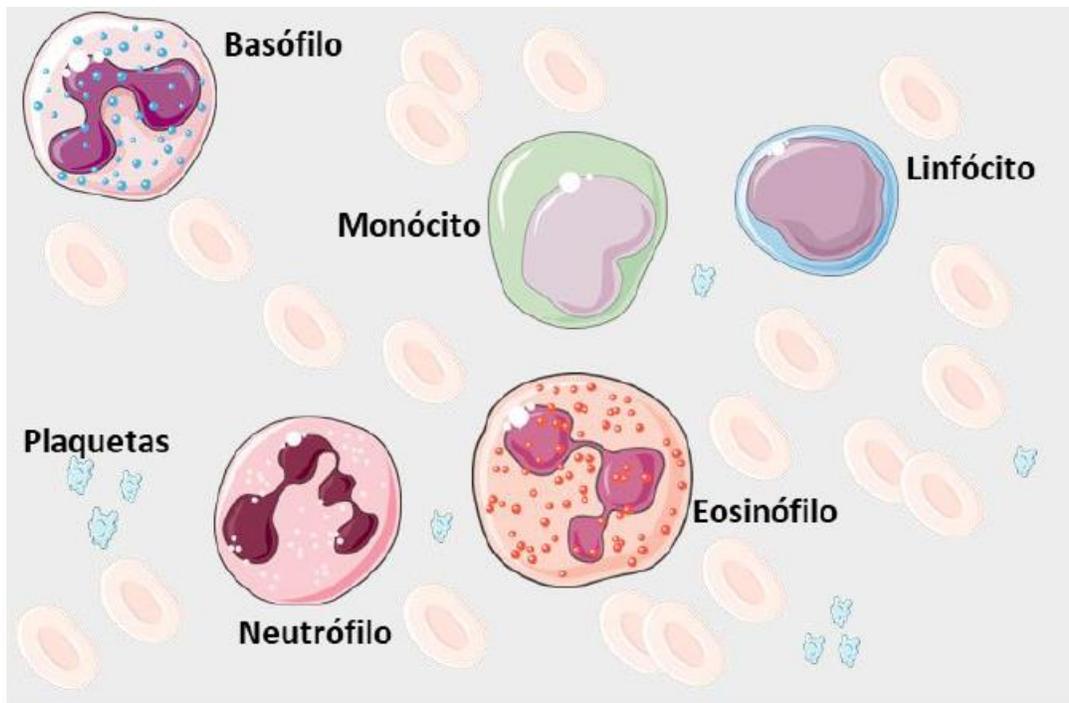


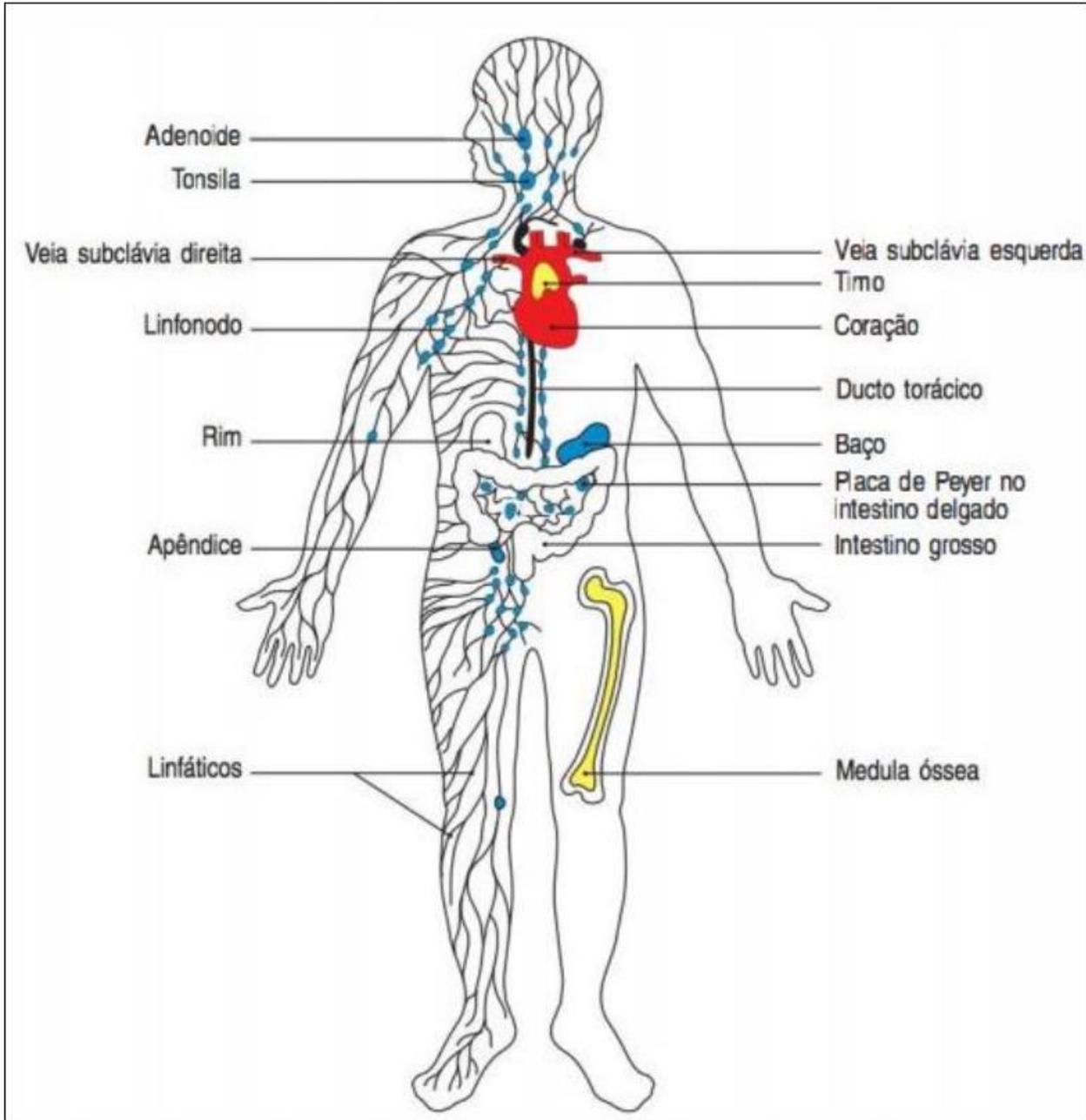
Figura 2: Comparação de células linfóides por microscopia óptica e eletrônica. Fonte: Adaptado de MURPHY, Kenneth. Imunobiologia de Janeway. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. xx, 868

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. Essa é mais uma das características que fazem do SI um sistema bem peculiar. Veja a figura 4.



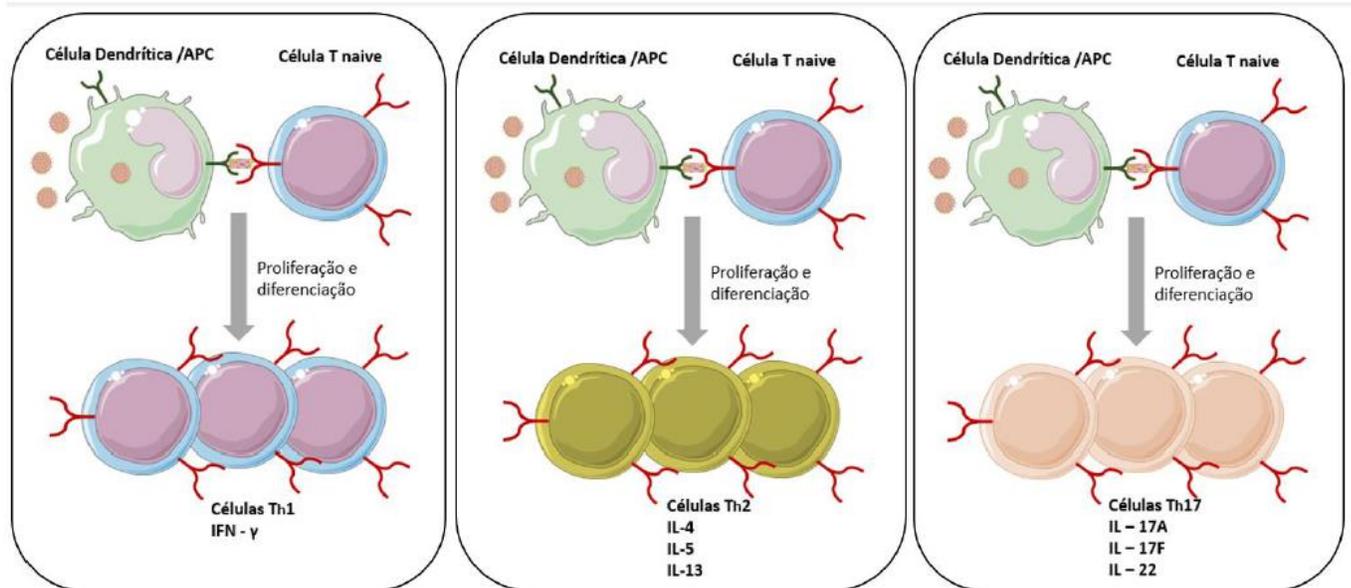
**Figura 4:** Distribuição do sistema imunológico. Fonte: MURPHY, Kenneth. Imunobiologia de Janeway. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. xx, . p.10.

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

## 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.

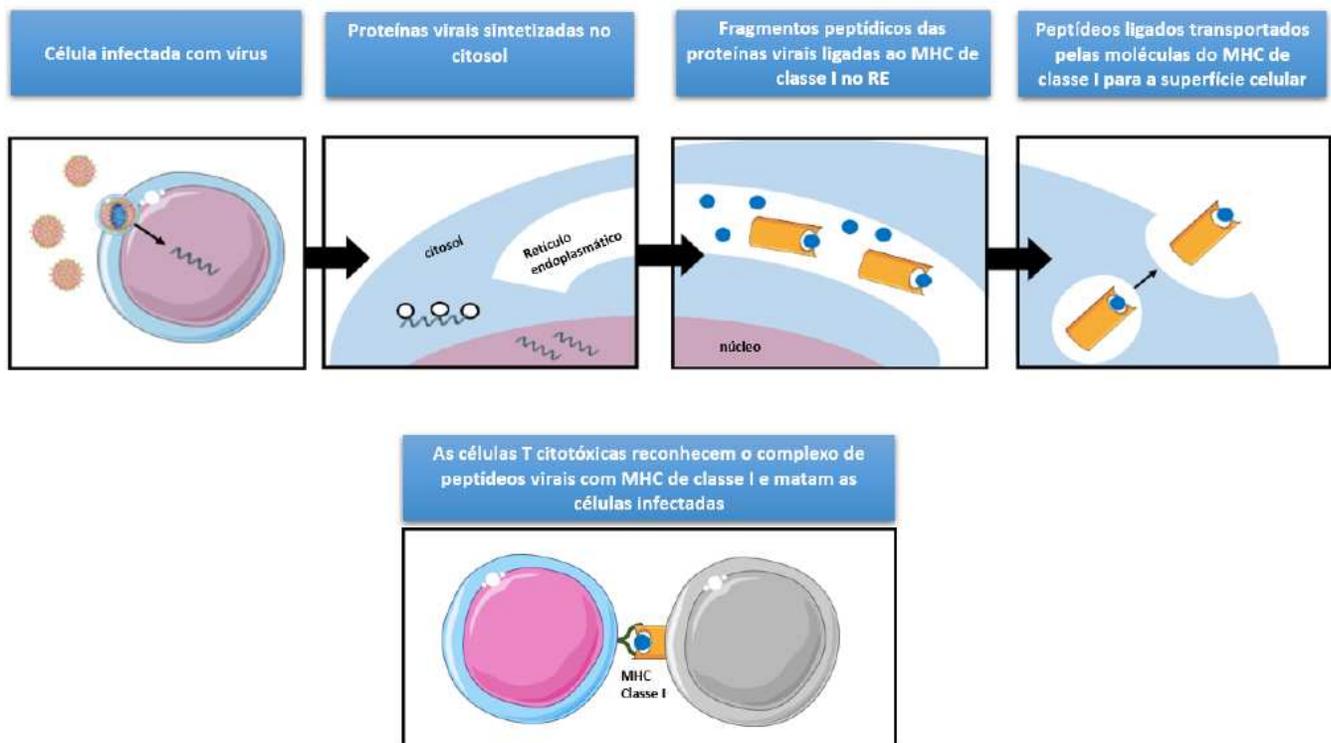
Após o reconhecimento do antígeno, os linfócitos T helper se diferenciam em células efetoras, sendo as mais estudadas na literatura a Th1, Th2, Th17 (figura 5) e Treg. Ao se diferenciarem, os linfócitos T auxiliares proliferam, gerando mais células efetoras e células de memória, que são capazes de manter-se por anos, ativando-se num contato futuro com aquele antígeno. Nessa seção foram utilizadas as referências 1 e 2, descritas no capítulo final desse documento.



**Figura 5:** Subpopulações de linfócitos T helper. Fonte: Adaptado de Abbas, A. K et al. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8ª ed. 2015. A ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

## LINFÓCITOS T CD8+

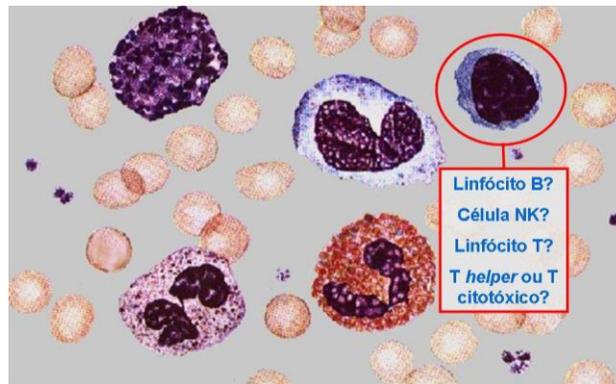
Os linfócitos T citotóxicos (T CD8+), por sua vez, têm a propriedade da citotoxicidade, isto é, de matar uma célula-alvo, desde que reconhecida especificamente como infectada ou tumoral. Por exemplo, um linfócito T auxiliar infectado pelo HIV expressa em sua superfície antígenos do vírus e pode ser reconhecido 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 6 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: Adaptado de MURPHY, Kenneth. Imunobiologia de Janeway. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. xx, . p.31. A ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

## IDENTIFICAÇÃO DOS LINFÓCITOS

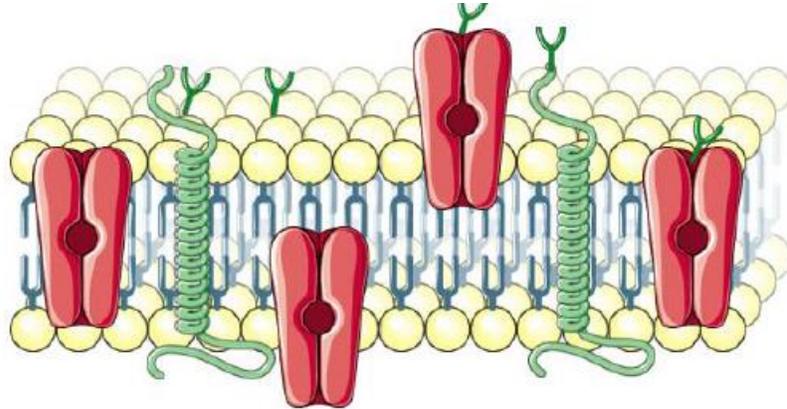
Na figura 7 é possível identificar facilmente um monócito, três granulócitos e um linfócito. Mas é possível dizer qual é a subpopulação de linfócito? Seria este um linfócito B, uma célula NK ou um linfócito T? Se fosse um linfócito T, seria um T auxiliar ou T citotóxico? Como poderíamos identificá-los?



**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 8, a membrana plasmática é composta por uma bicamada de fosfolípidos com proteínas e glicoproteínas imersas nesta bicamada. As proteínas e glicoproteínas são os marcadores de superfície.

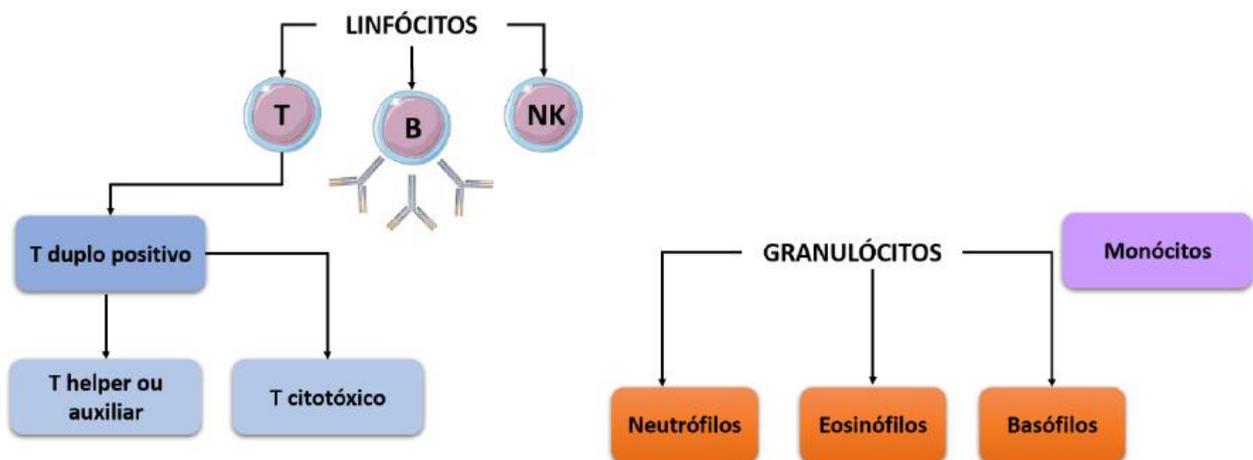


**Figura 8:** Marcadores de Superfície. Fonte: Adaptado de MURPHY, Kenneth. Imunobiologia de Janeway. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014. A ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

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.

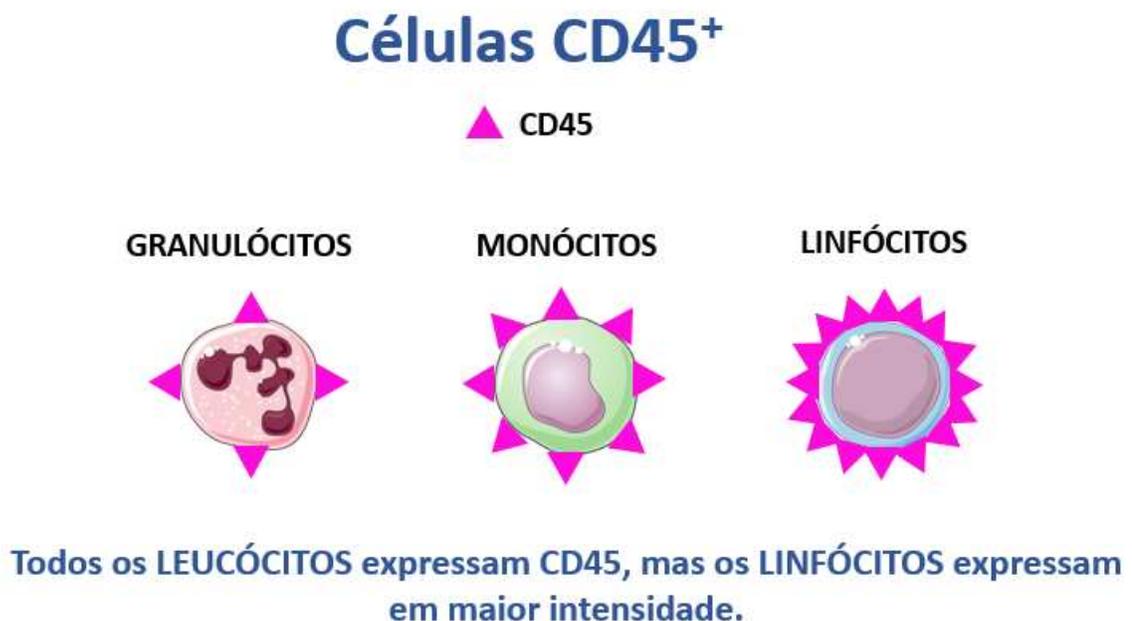
## Células CD45+

Marcador pan-leucocitário (todos os leucócitos são CD45+)



**Figura 9:** Células CD45 positivas.

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.

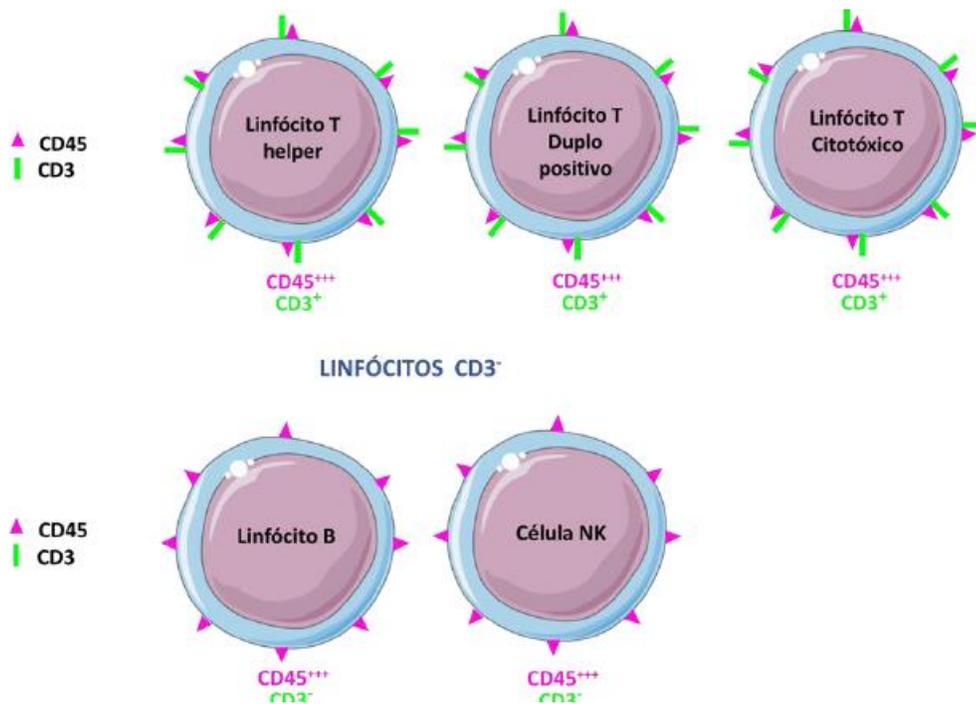


Essas porcentagens, bem como a contagem absoluta de linfócitos totais são importantes para os clínicos porque, entre outras aplicações, permitem-lhes determinar se o paciente tem uma queda especificamente de linfócitos T auxiliares (o que é causado pelo HIV) ou se tem uma queda geral dos linfócitos (o que poderia ser causado por outra patologia).

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

### 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-.

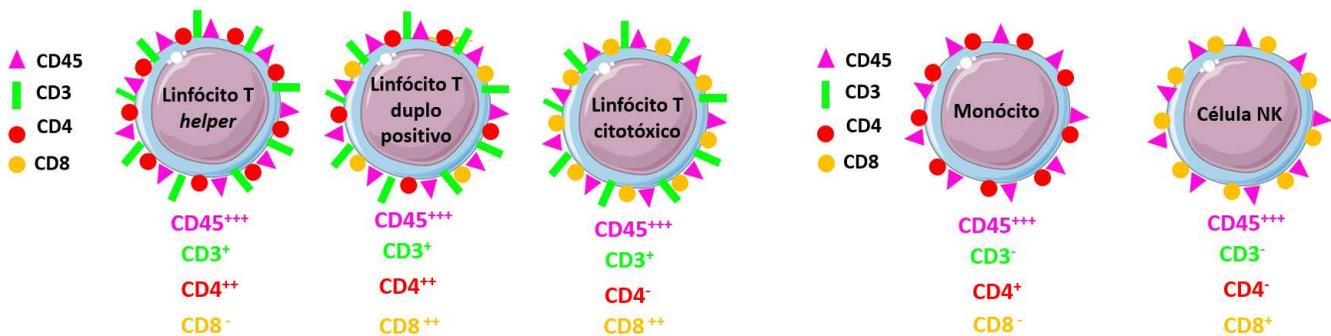


**Figura 11:** Linfócitos CD3+ (esquerda) e linfócitos CD3 - (abaixo). Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

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 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?

---

---

4. Quais são as subpopulações de linfócitos T?

---

---

5. Que marcador de superfície identifica os linfócitos T?

---

6. Que células são positivas para CD45?

---

---

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 vantagens 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?

---

---

---



## SÍNDROME DA IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (Aids)

A Aids é uma síndrome recente (sua descrição se deu em 1981 pelo CDC-EUA). O aumento de notificações de pacientes com déficit grave de linfócitos T *helper* despertou as autoridades de saúde para o problema. Constatou-se que estes pacientes eram muito suscetíveis a infecções oportunistas e a tumores como o sarcoma de Kaposi. Posteriormente, após grande trabalho de pesquisa, demonstrou-se que o vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency virus* – HIV) era o agente causador da aids. Nessa seção foram utilizadas as referências 1, 2, 3 e 5 descritas no capítulo final desse documento.

## CICLO DE VIDA DO HIV

Como todos os vírus, o HIV é um parasita obrigatório, isto é, o vírus só consegue se reproduzir utilizando a maquinaria da célula hospedeira. O HIV tem seu material genético na forma de ácido ribonucléico (RNA). 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-stranded*, em inglês) de DNA a partir do RNA viral. A transcriptase reversa é uma DNA polimerase dependente de RNA, isto é, é capaz de produzir um DNA complementar a partir de um RNA por meio de um processo conhecido como **transcrição reversa**. O que representa a reversão do dogma central da biologia molecular, que diz que o DNA dá origem ao RNA (transcrição) e este, por sua vez, dá origem às proteínas (tradução). Após a geração do DNA pela transcrição reversa, ocorre o processo conhecido como **integração**. Pela ação da **integrase**, o DNA viral se integra ao genoma do linfócito T *helper*, formando o que se chama pró-vírus de DNA. O DNA viral integrado no genoma do linfócito T *helper* passa a ser transcrito para RNA, que, por sua vez é traduzido nas proteínas que serão parte do capsídeo e do envelope viral. A transcrição e a tradução referidas ocorrem por meio das enzimas da célula hospedeira. A **protease** cliva



as proteínas do HIV recém-formadas para que estas se adaptem à conformação do vírus. Após a montagem dos novos vírus, ocorre o brotamento, que é a liberação dessas novas partículas virais para o ambiente extracelular.

Os vírus liberados estão prontos para infectar outras células e repetir o ciclo reprodutivo. Para que se tenha idéia da rapidez dos eventos, do momento da fusão até a liberação das novas partículas virais passam-se apenas 24 horas.

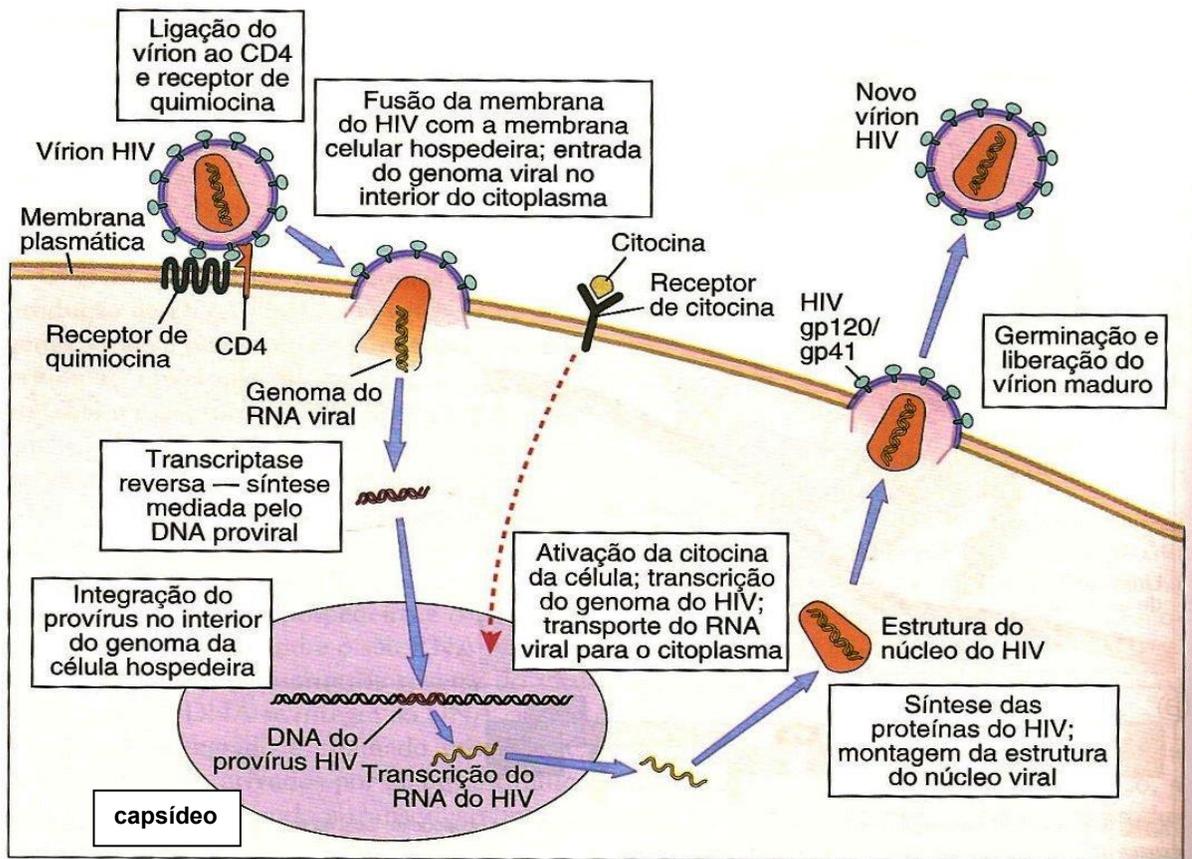


Figura 13: Ciclo de reprodução do vírus HIV. Fonte: Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 8ª ed. 2015.

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 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 14, inicialmente, há um aumento repentino da carga viral, que leva a uma queda brusca da contagem de linfócitos T CD4+. Esta fase é conhecida como **síndrome aguda**. Em seguida, com o início da resposta imune específica contra o vírus, a carga viral diminui, mas o vírus não é eliminado, permanecendo com um número de cópias mínimo por um longo período (meses a anos). Como consequência, a contagem de células T *helper* 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”.



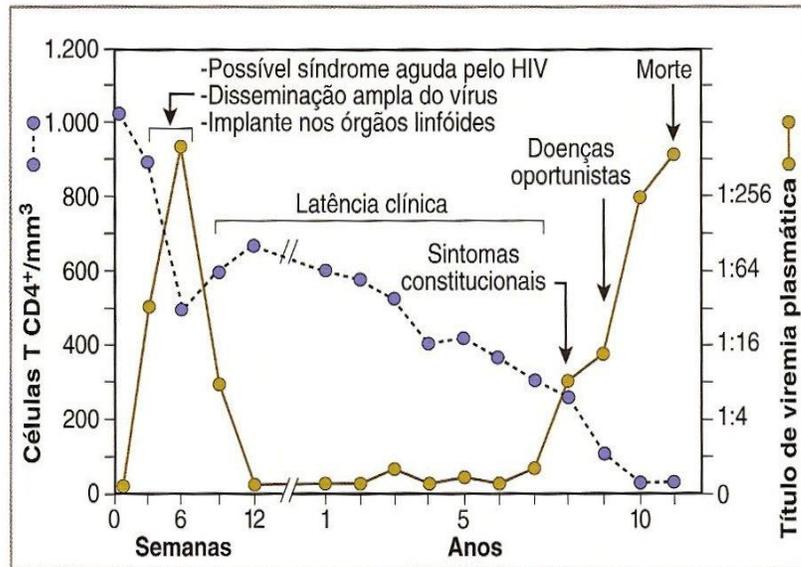


Figura 14: Contagem de LT CD4+ vs Viremia plasmática. Fonte: Abbas, A. K et al. Imunologia Celular e Molecular. Elsevier, 8ª ed. 2015.

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 antirretrovirais, 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 condição imunológica e virológica de pessoas vivendo com HIV. O monitoramento auxilia o clínico responsável na urgência de início da terapia antirretroviral, profilaxia para infecções oportunistas e modificação do tratamento. Com esse exame, é possível avaliar o grau de comprometimento do sistema imune e a recuperação da resposta imunológica com o tratamento adequado, além de definir o momento de interromper as eventuais profilaxias.

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

### Frequência de solicitação de exame de contagem de LTCD4+ para monitoramento laboratorial de

SITUAÇÃO CLÍNICA	CONTAGEM DE LT-CD4+	FREQUÊNCIA DE SOLICITAÇÃO
PVHIV com:	CD4 < 350 céls/mm <sup>3</sup>	A cada 6 meses <sup>(b)</sup>
<ul style="list-style-type: none"> <li>› Em uso de TARV; e</li> <li>› Assintomática; e</li> <li>› Com carga viral indetectável</li> </ul>	CD4 > 350 céls/mm <sup>3</sup> em dois exames consecutivos, com pelo menos 6 meses de intervalo	Não solicitar
PVHIV que NÃO apresentem as condições acima, tais como:	Qualquer valor de LT-CD4+	A cada 6 meses <sup>(b)</sup>
<ul style="list-style-type: none"> <li>› Sem uso de TARV; ou</li> <li>› Evento clínico<sup>(a)</sup>; ou</li> <li>› Em falha virológica</li> </ul>		

Fonte: DIAHV/SVS/MS.

<sup>(a)</sup> Infecções (inclusive IO), toxicidade e possíveis causas de linfopenias (neoplasias, uso de interferon etc.).

<sup>(b)</sup> Pacientes em uso de profilaxia de IO podem ter a frequência de solicitação de contagem de LT-CD4+ reduzida para três meses, a fim de avaliar critérios de resposta imunológica para suspensão ou manutenção da profilaxia.

### PVHIV, de acordo com a situação clínica

Fonte: DIAHV/SVS/Ministério da Saúde.

É importante salientar que pacientes com a situação clínica estável, em terapia antirretroviral, com carga viral indetectável e contagem de LTCD4+ acima de 350 céls/mm<sup>3</sup>, a realização do exame de LTCD4+ não traz nenhum benefício ao monitoramento clínico-laboratorial.

Desde dezembro de 2013, o DCCI/SVS do Ministério da Saúde recomenda início imediato da terapia antirretroviral para todas as pessoas vivendo com HIV, independentemente do seu estágio clínico e/ou imunológico.



A recomendação de início precoce da terapia antirretroviral considera, além dos claros benefícios relacionados à redução da morbimortalidade em pessoas que vivem com HIV, a diminuição da transmissão da infecção, o impacto na redução da tuberculose – a qual constitui principal causa infecciosa de óbitos no Brasil e no mundo – e a disponibilidade de opções terapêuticas mais cômodas e bem tolerada. Nessa seção foi utilizada a referência 7 descrita no capítulo final desse documento.

**A) 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 <sup>3</sup> (>20%)	Indicar o uso
200–350 céls/mm <sup>3</sup> (15%–19%)	Avaliar parâmetros clínicos e risco epidemiológico para a tomada de decisão
<200 céls/mm <sup>3</sup> (<15%)	Não vacinar

Fonte: DIAHV/SVS/MS.

Fonte: 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, 1ª edição, 2017.

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



## 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?

---

---

---



## 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.

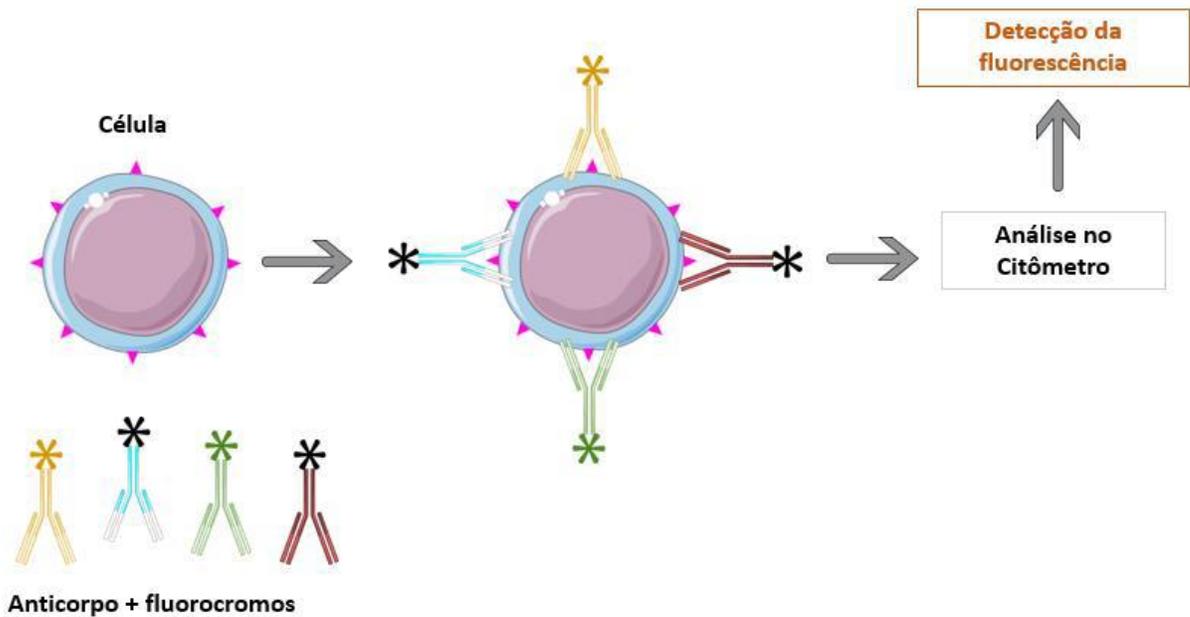
É possível se analisar qualquer partícula ou célula com tamanho de 0,2 a 50 micrômetros por citometria de fluxo, ou seja, cromossomos, células sanguíneas, protozoários, algas, etc. Porém, antes de se iniciar uma análise, é necessário conhecer as configurações do instrumento a fim de ter certeza que o 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 granulidade 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 granulidade também pode-se determinar o tipo celular de acordo com a expressão de marcadores de superfície e/ou intracelulares e essa metodologia é conhecida como Imunofenotipagem por citometria de fluxo.





**Figura 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 exemplo, o fluorocromo FITC é excitado pelo laser azul de comprimento de onda de 488 nm e emite uma fluorescência de comprimento de onda de 520 nm.

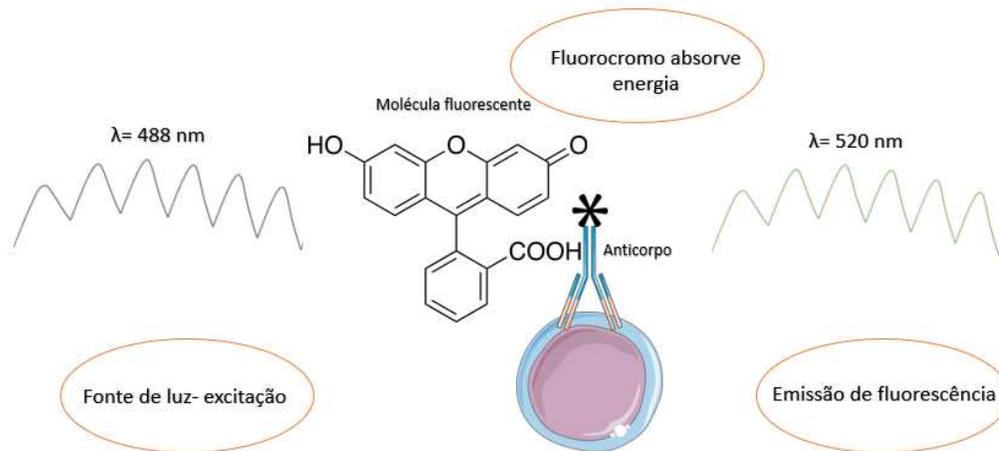


Figura 16: Emissão de fluorescência. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

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

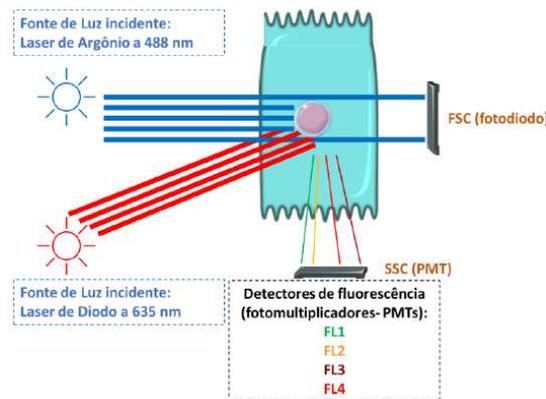


Figura 17: Princípio básico da citometria de fluxo. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>



O primeiro fotodetector capta luz de comprimento de onda de 495 a 559 nm, que corresponde à luz verde. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o FITC. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD3.

O segundo fotodetector capta luz de comprimento de onda de 544 a 628 nm, o que corresponde à luz laranja. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o PE. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD8.

O terceiro fotodetector capta luz de comprimento de onda de 646 a 754 nm, o que corresponde à luz vinho. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o PerCP. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD45.

O quarto fotodetector capta luz de comprimento de onda de 650 a 670 nm, o que corresponde à luz vermelha. O fluorocromo que emite fluorescência nesse comprimento de onda e que faz parte do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC é o APC. No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo monoclonal que está conjugado a esse fluorocromo é o anti-CD4.

Veja na tabela abaixo a combinação de anticorpos/fluorocromos/fotodetector para o reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC:

<b>Anticorpo conjugado</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>Detector</b>
Anti-CD3	FITC	FITC
Anti-CD8	PE	PE
Anti-CD45	PerCP	PerCP-Cy5.5
Anti-CD4	APC	APC

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

Nessa seção foram utilizadas a referência 8 descrita no capítulo final desse documento e a instrução de uso do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC.

## SISTEMAS

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

- A) Sistema de Fluidos
- B) Sistema Óptico



C) Sistema Eletrônico

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

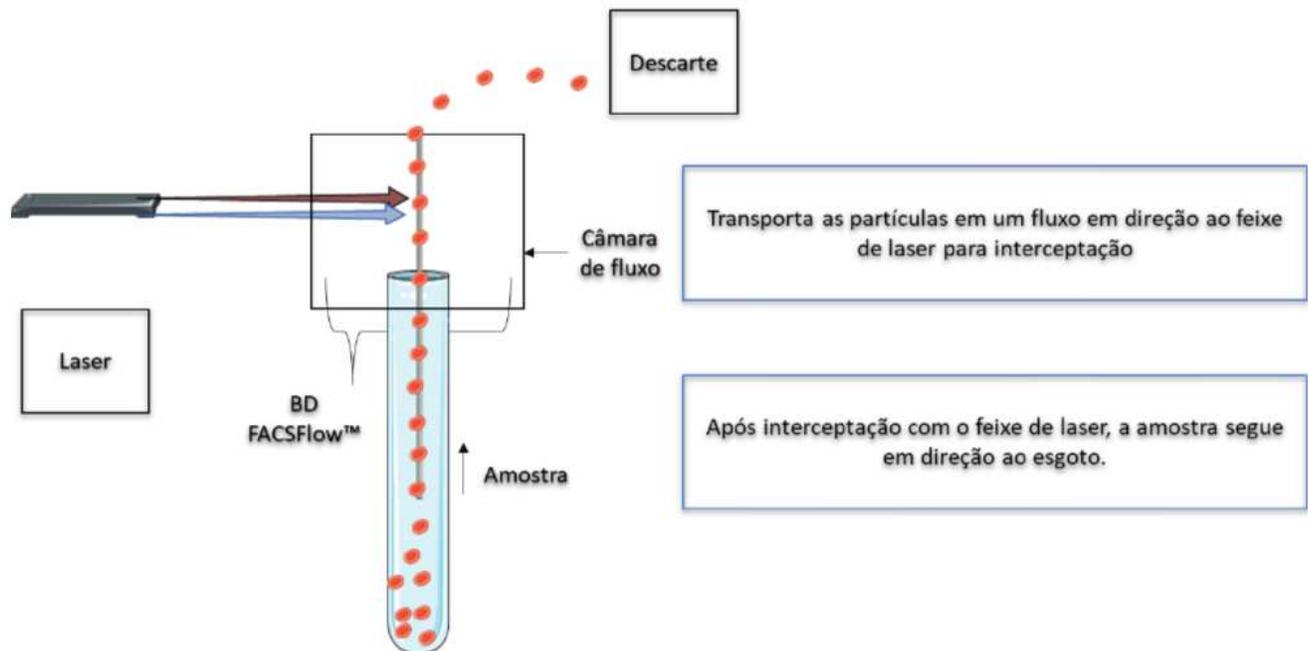


Figura 18: Sistema Fluídico. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

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

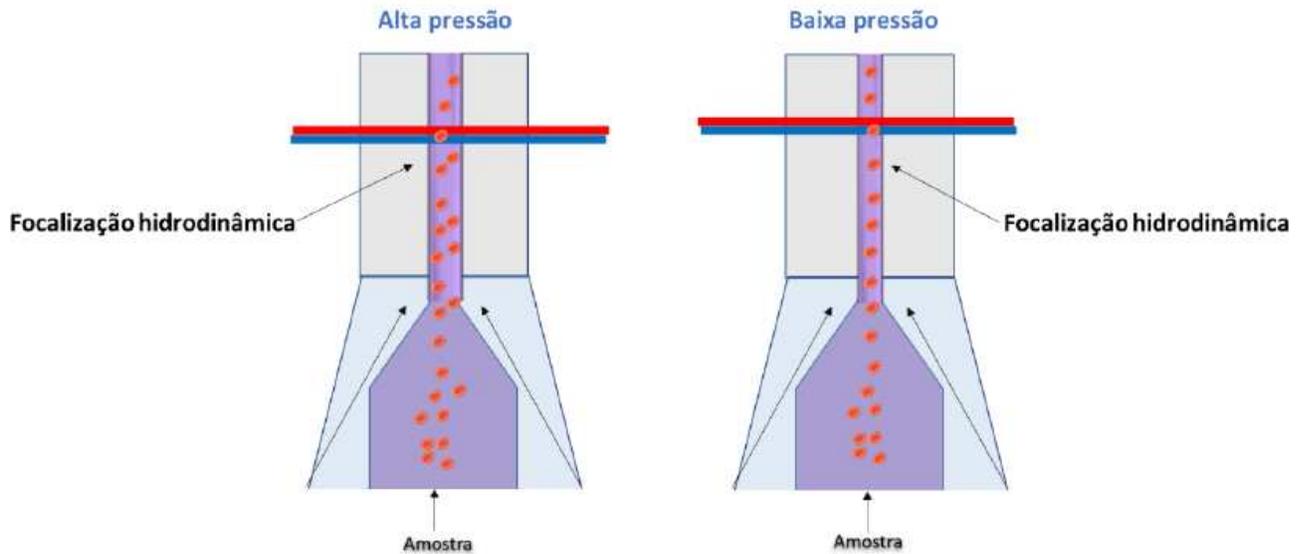


Figura 19: Vazão de amostra. Fonte: a ilustração usa elementos do Servier Medical Art <https://smart.servier.com/>.

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.

Detector	Filtro	Fluorocromo	Pico de Emissão	Cor da Emissão	Excitação	Marcador
1	BP 527/32 nm	FITC	520nm	Verde	laser azul	CD3
2	BP 586/42 nm	PE	575nm	Laranja	laser azul	CD8
3	BP 700/54 nm	PerCP	675nm	Vinho	laser azul	CD45
4	BP 660/10 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. A área 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, FITC, PE, PercP e APC), em uma *list mode data*. Em seguida, o sinal luminoso é exibido na posição apropriada no gráfico de dados. Os dados gerados pelo citômetro de fluxo são armazenados de acordo com um formato padrão – FCS (*Flow Cytometry Standard*).



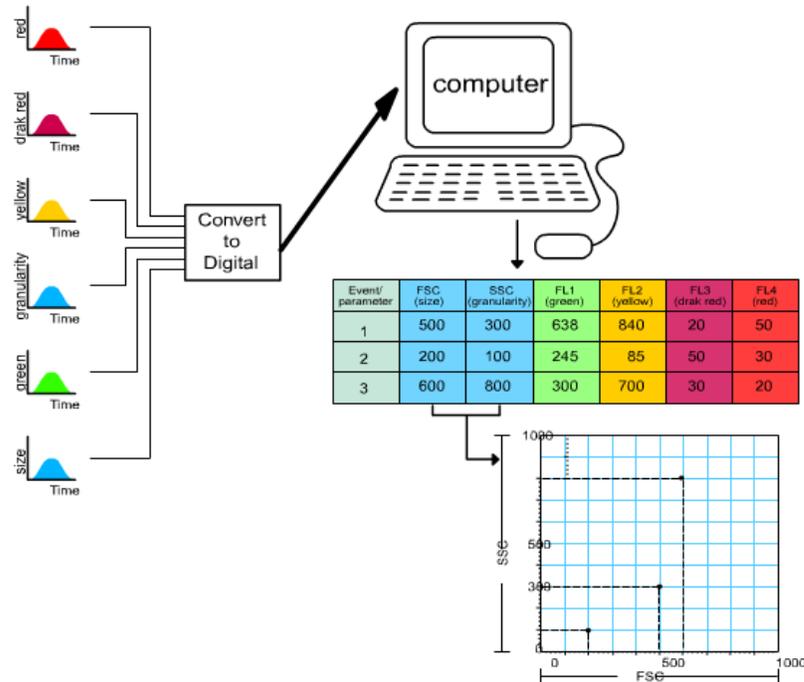


Figura 20: Sistema Eletrônico.

Os dados podem ser visualizados em diversos formatos. Um único parâmetro, FSC ou FITC, 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 área 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.

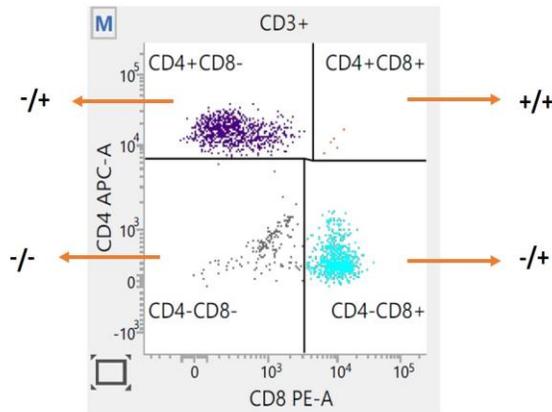


Figura 21: Como interpretar um dot plot.

### VISUALIZAÇÃO DOS DADOS NO BD FACSLYTIC™ CLINICAL SOFTWARE

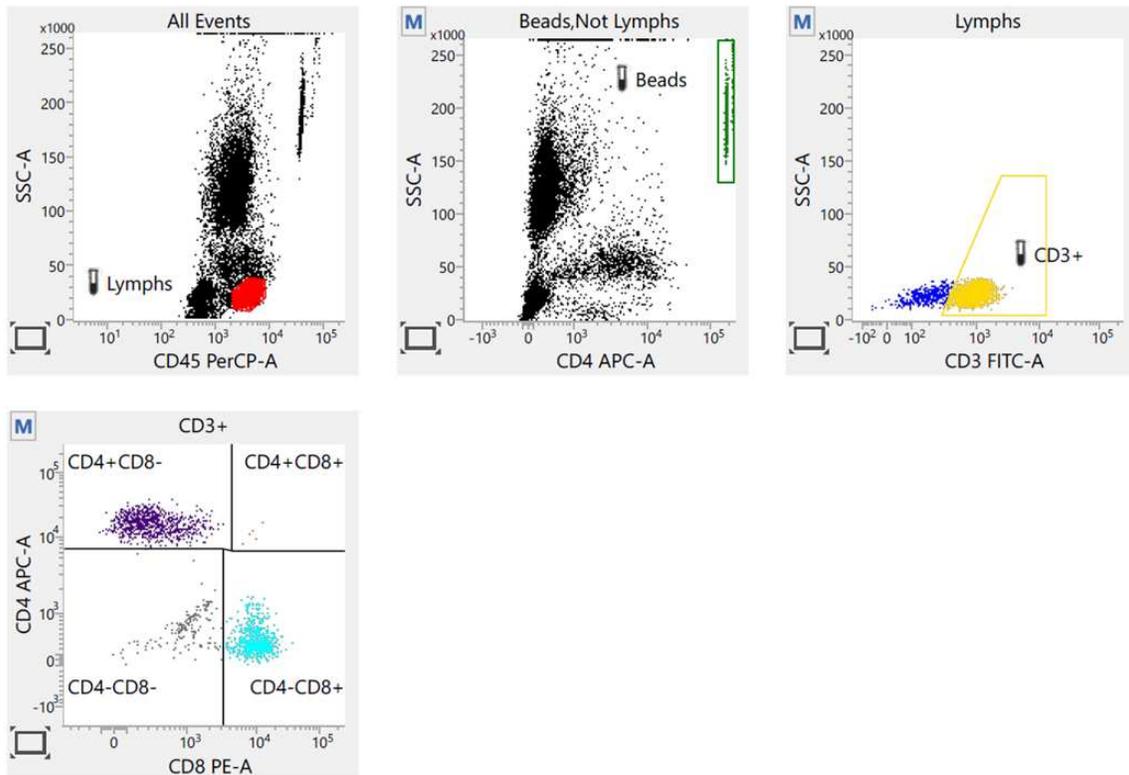


Figura 22: Dotplots representativos da análise de Linfócitos T CD4 no BD FACSuite Clinical Software



APRESENTAÇÃO DO EQUIPAMENTO

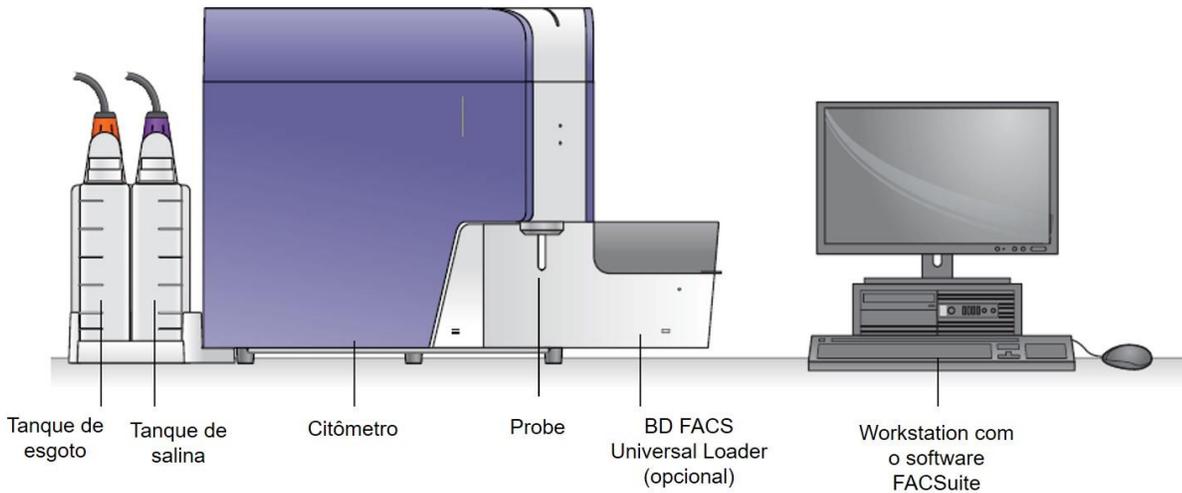
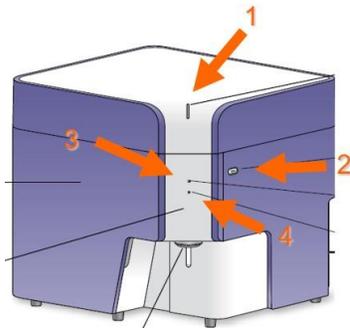


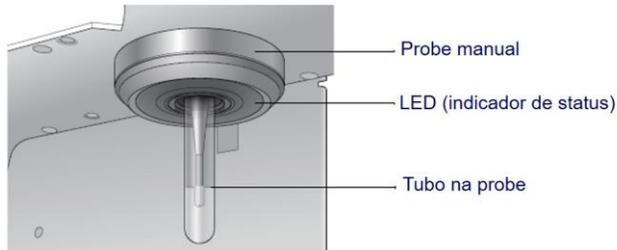
Figura 23: Apresentação do equipamento



Indicador	Condição	Status
Indicador do status do citômetro (1)	Verde	Pronto para o trabalho
	Âmbar	Condição de falha
	Piscando em âmbar	Aquecimento
	Vermelho	Sistema inoperante
Botão de ligar (2)	Âmbar	Energia desligada para todos os sistemas
	Verde	Energia ligada
	Piscando em verde	Processo de desligamento (shutdown) iniciado
Status de aquisição (3)	OFF	Não adquirir amostra
	Piscando em azul	Adquirindo amostra
Status dos fluidos (4)	OFF	Pronto
	Piscando em âmbar	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nível de salina baixo</li> <li>• Esgoto quase cheio</li> </ul>
	Vermelho	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tanque de salina vazio</li> <li>• Esgoto cheio</li> <li>• Esgoto desconectado</li> </ul>

Figura 24: Indicadores luminosos





Indicador	Condição	Status
Indicador LED na Probe	Verde	Pronto para aceitar o tubo
	Piscando em âmbar	SIT Flush em andamento, não adicionar tubo
	OFF	Tubo na probe

**Figura 25:** Indicadores luminosos da probe

## PREPARAÇÃO 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 BD FACSTFlow™ (Roxo)	BD FACSTFlow™ (cada caixa contém: 20L cada)	Preencha o tanque com BD FACSTFlow™.
Tanque de descarte (Laranja)	Hipoclorito	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. Ligue o sistema pressionando o botão Power. O botão Power se torna verde quando o sistema é ligado.
3. Aguarde 20 minutos para o sistema aquecer antes de iniciar qualquer trabalho de aquisição. Durante este período não se permite realizar qualquer tipo de aquisição.
4. Ligue o computador e inicie com este usuário:
  - a. USER: Administrator
  - b. PASSWORD: BDIS#1



5. Inicie a sessão do software BD FACSuite Clinical.
  - a. Clique duas vezes no ícone BD FACSuite Clinical para iniciar o software e insira o nome do usuário e senha:
    - i. USER: BDadministrator
    - ii. PASSWORD: bdadministrator.
  - b. Confirme que você leu e entendeu a declaração na tela de login e assinale a caixa.
  - c. Clique em OK.
6. Verifique se o software está conectado ao citômetro olhando o ícone de status verde Connected (Conectado), localizado no canto inferior esquerdo do espaço de trabalho.
7. Verifique se o sistema fluídico está pronto observado o ícone de status verde Fluidics (Fluídico) localizado no canto inferior direito do espaço de trabalho.
8. Realize os procedimentos para retirada de bolhas do sistema:
  - a. Selecione Cytometer > Fluidics > Purge Sheath Filter (Citômetro > Fluídos > Purgar Filtro de Fluido de Sheath) e realize este comando três vezes.
  - b. Selecione Cytometer > Fluidics > Drain and fill flow cell (Citômetro > Fluídos > Drenar e preencher célula de fluxo) e realize este comando três vezes.
9. Ao final deste processo, o citometro está pronto para a realização do controle de qualidade.



# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

## BD FACSLytic™ – Módulo Básico

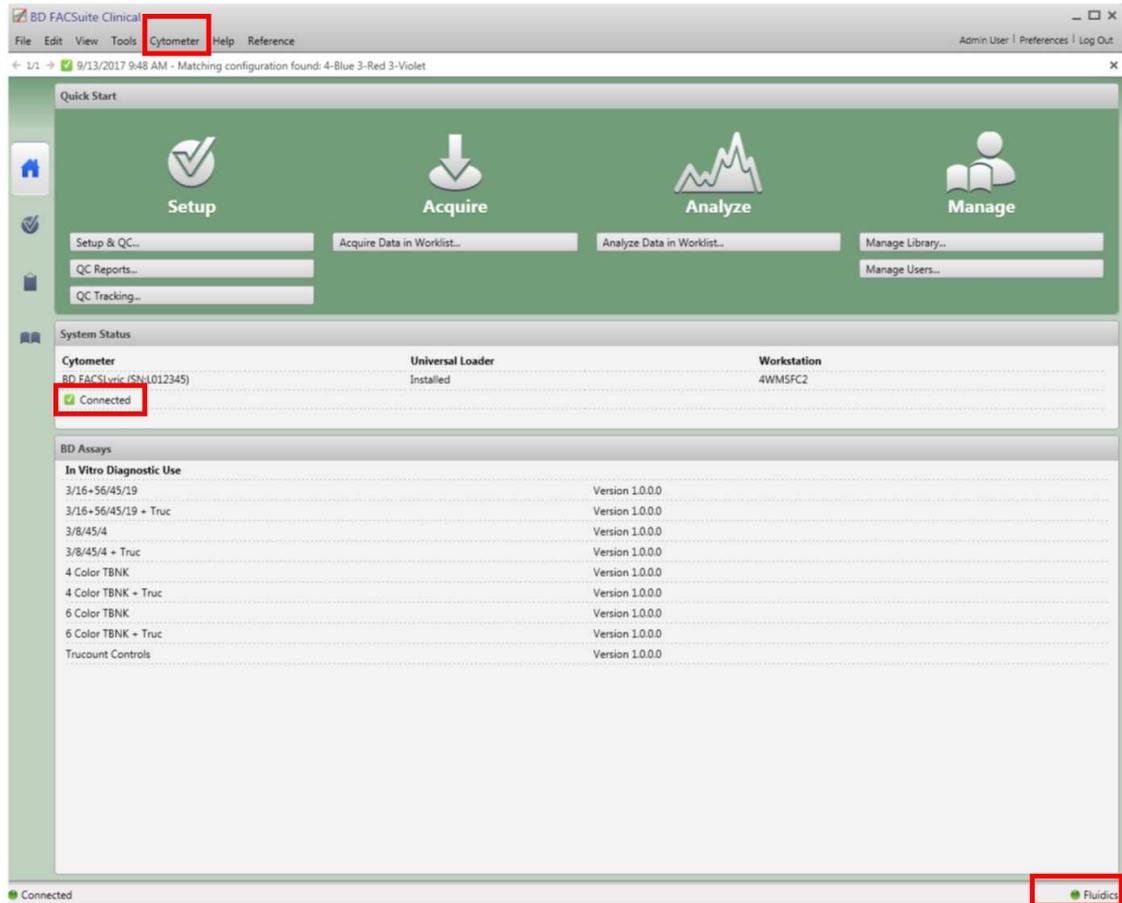


Figura 26: Interface do BD FACSLytic™ Clinical Software



**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:

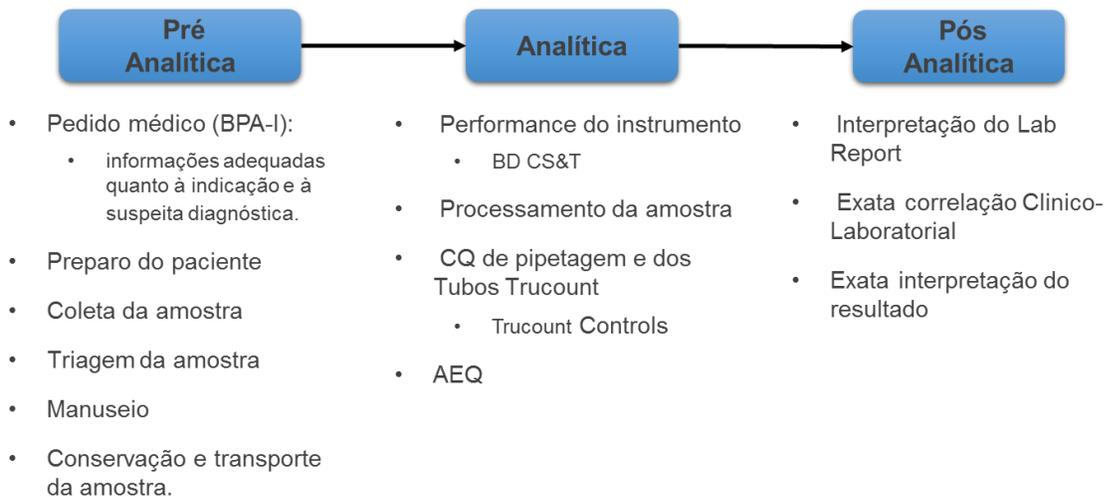
No reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, o anticorpo anti- (COLUNA 1) é conjugado ao fluorocromo (COLUNA 2). Ao ser excitado pelo laser (COLUNA 3).

<u>COLUNA 1</u>	<u>COLUNA 2</u>	<u>COLUNA 3</u>
CD3	_____	_____
CD4	_____	_____
CD8	_____	_____
CD45	_____	_____



## 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 coletada em tubos EDTA K<sub>2</sub> ou K<sub>3</sub>, armazenada em temperatura ambiente 20°C a 25°C até o processamento, que deve ocorrer em até no máximo 48 horas após a coleta. O reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC não foi validado para utilização em amostras coletadas com heparina ou ácido cítrico em dextrose (ACD).
- Triagem da amostra:** verificar se a amostra está devidamente identificada, se a requisição médica confere com a identificação do paciente no tubo, se a amostra foi colhida com EDTA e se o volume de sangue colhido é o especificado. Nessa fase, é muito importante que as características físicas da amostra também sejam observadas (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 sobrevivência das outras células do sangue. Por isso, amostras hemolisadas devem ser rejeitadas. A hemólise fora do organismo, ou seja, *in vitro* pode acontecer quando o sangue é armazenado sob temperaturas extremas (muito altas ou muito baixas), em casos em que o sangue é colhido de forma inadequada ou ainda quando a proporção de sangue e anticoagulante não é respeitada (amostras com volume de sangue menor que o recomendado para o tubo - Ideal:  $1,5 \pm 0,5$  mg/mL de sangue). Amostras que chegarem ao laboratório fora do intervalo de temperatura aceitável, mas que não apresentem características físicas de hemólise podem ser processadas porém, no laudo de liberação do resultado da amostra deve estar contida a informação relacionada ao transporte ou acondicionamento incorreto da mesma. Amostras coaguladas ou com fibrina não devem ser processadas, pois a presença de coágulos e fibrinas podem causar o entupimento do citômetro e ainda prejudicam a marcação homogênea da amostra, fazendo com que os resultados gerados não sejam verdadeiros. **Amostras de sangue ictericas e lipêmicas podem ser processadas normalmente e adquiridas no citômetro.** Para esses dois tipos de amostra, onde se tem a presença de moléculas que atrapalham a dispersão de luz, recomendamos que a 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 superiores a 37°C) causam destruição celular e afetam os resultados da citometria de fluxo. No transporte de amostras, em regiões muito quentes, as amostras devem ser armazenadas em recipiente isolado e colocadas dentro de outro recipiente contendo gelo reciclável (-20°C) e material absorvente, se necessário. Dessa forma é possível manter as amostras em temperatura ambiente, mesmo em regiões muito quente.



## **FASE ANALÍTICA**

Nessa fase, daremos foco nas etapas: **Controle de qualidade do equipamento, Compensação, Processamento da amostra, Controle de qualidade de pipetagem e tubos BD Trucount™ Absolute Count Tubes.**

### **Controle de qualidade do equipamento/Calibração**

A calibração do instrumento constitui uma das principais etapas do trabalho com citometria de fluxo. Ela garante a correta distribuição das células nos gráficos e mostra se o instrumento utilizado na aquisição e análise dos dados está operando com total eficiência. Para a calibração do BD FACSLyric™, utiliza-se o reagente BD™ CS&T BEADS.

O BD™ CS&T BEADS 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, apresentada e analisada pelo software. O BD™ CS&T BEADS permite ao software avaliar o alinhamento do laser, 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. Assim, o BD™ CS&T BEADS atua como controle de qualidade e calibrador do equipamento e deve ser utilizado todos os dias em que a rotina for executada. O BD™ CS&T BEADS é fornecido em uma caixa contendo dois ou seis frascos de 3 ml cada, sendo suficientes para 50 e 150 testes respectivamente. Esse processo de calibração no BD FACSLyric™ é dividido em 2 etapas:

### **Characterization QC (Caracterização do QC)**

O objetivo do **Characterization CQ** (Caracterização do QC (CQC)) é caracterizar e estabelecer valores de linha de base para as medições que serão utilizadas para acompanhar o desempenho do citômetro. Durante esse procedimento o software executa o alinhamento do laser, define os valores iniciais de coeficiente de variação robusto (%rCV), linearidade e sensibilidade do equipamento. Determina as tensões iniciais dos PMTs para colocar as esferas brilhantes nos canais desejados. Este é um procedimento realizado inicialmente pela equipe de engenharia e posteriormente executado pelos usuários nos seguintes casos: a cada seis meses, após troca de lote do CS&T ou intervenção da equipe de engenharia no equipamento.



O preparo do BD™ CS&T BEADS 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 realizar o **Characterization QC**:

1. Separe e identifique um tubo de citometria
2. Homogeneíze o frasco de BD™ CS&T BEADS, invertendo-o vigorosamente 10 vezes ou agitando-o em um vórtex à velocidade média durante 5–10 segundos.
3. No tubo de citometria, pipete 1000µL de BD FACSSuite™ filtrada e pingue 4 gotas de BD™ CS&T BEADS.
4. Homogeneíze o tubo num vórtex antes da utilização.
5. Faça a leitura no software do equipamento.

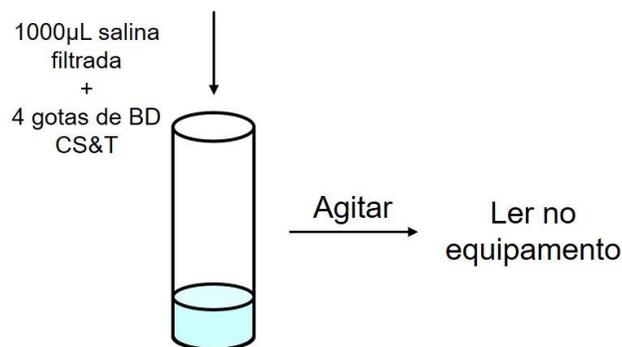


Figura 27 : Preparo do BD™ CS&T BEADS, para o Characterization QC

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

Para executar o Characterization QC (Caracterização do QC):

1. Abra o BD FACSSuite™ Clinical Software.
2. Na barra de navegação, clique em Setup & QC, se necessário, selecione a aba Setup & QC.
3. O resultado atual do **Characterization CQ** (Caracterização do QC) e o tempo decorrido desde que o teste foi realizado são mostrados no canto superior direito. Este procedimento deve ser realizado **a cada seis meses, após troca de lote do CS&T ou intervenção da equipe de engenharia no equipamento.**



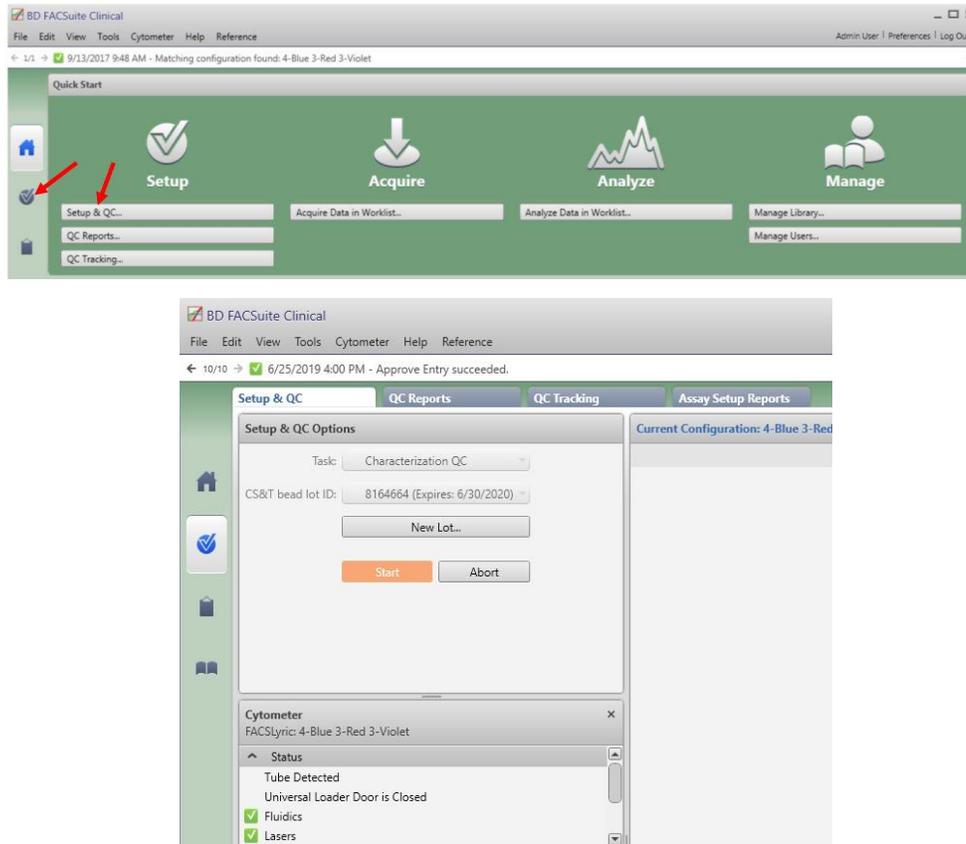


Figura 28 : Software BD FACSSuite Clinical para execução do Characterization QC

4. Selecione no menu **Task** (Tarefa) **Characterization QC**(Caracterização do QC).
5. Selecione o lote de esferas no menu BD™ CS&T Bead Lot (Lote de BD™ CS&T Beads).
  - a. O lote de esferas a ser utilizado é o número de lote impresso no tubo, não na caixa.
6. Carregue o tubo de esferas CS&T preparado na porta manual de tubos e clique em **Start** (Iniciar)
7. O software BD FACSuite exibe detalhes da tarefa no painel **Setup Tasks**. As marcas de verificação verdes, no canto inferior a esquerda, indicam a conclusão de um passo na tarefa.



# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

## BD FACSLytic™ – Módulo Básico

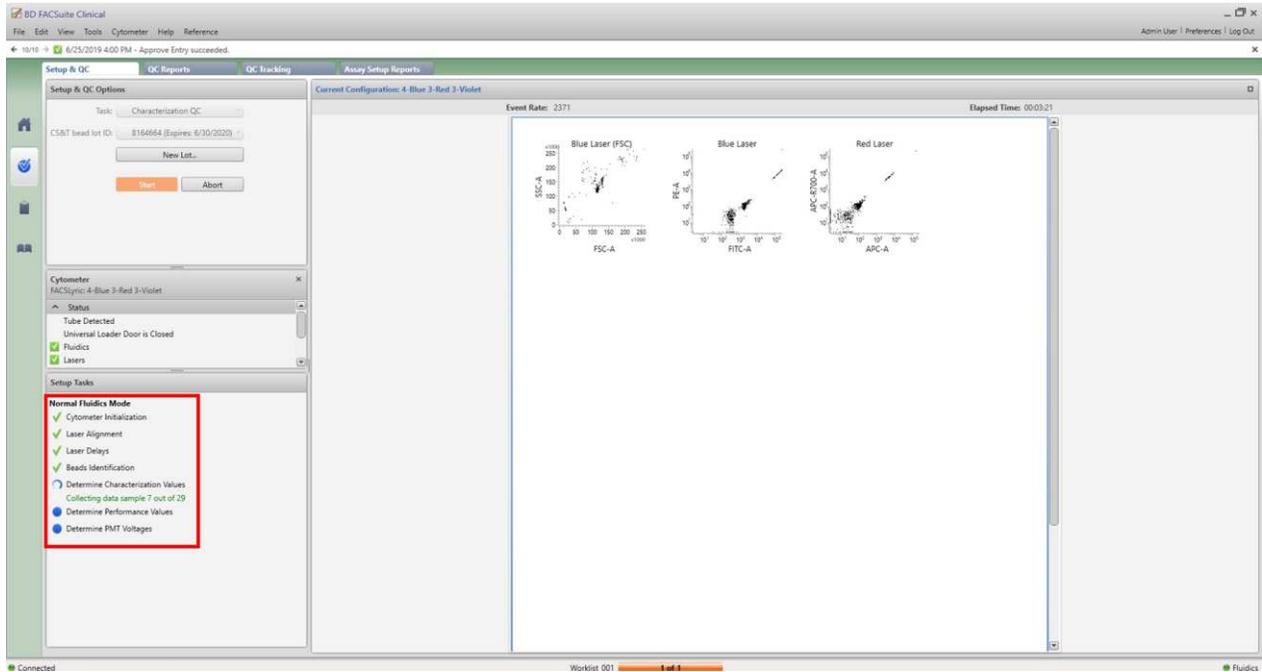


Figura 29: Software BD FACSSuite Clinical durante a execução do Characterization QC

8. Ao concluir a tarefa de **Characterization CQ** (Caracterização do QC), um diálogo de conclusão abre e indica se a tarefa foi bem-sucedida ou se erros ocorreram.

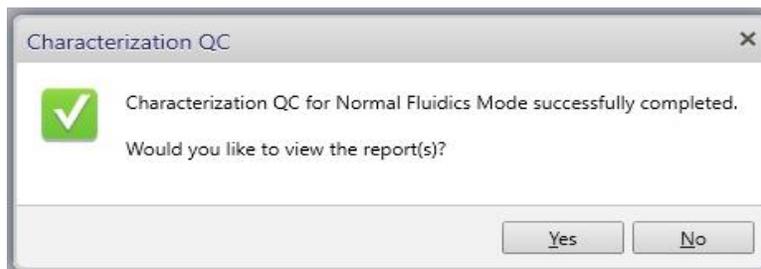


Figura 30: Dialogo da conclusão do Characterization QC

9. Clique em **Yes** (Sim) para visualizar o relatório. Caso contrário, clique em **No** (Não).
10. Remova o tubo de esferas CS&T e coloque um tubo de água DI na porta do tubo manual.



# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+ BD FACSLytic™ – Módulo Básico

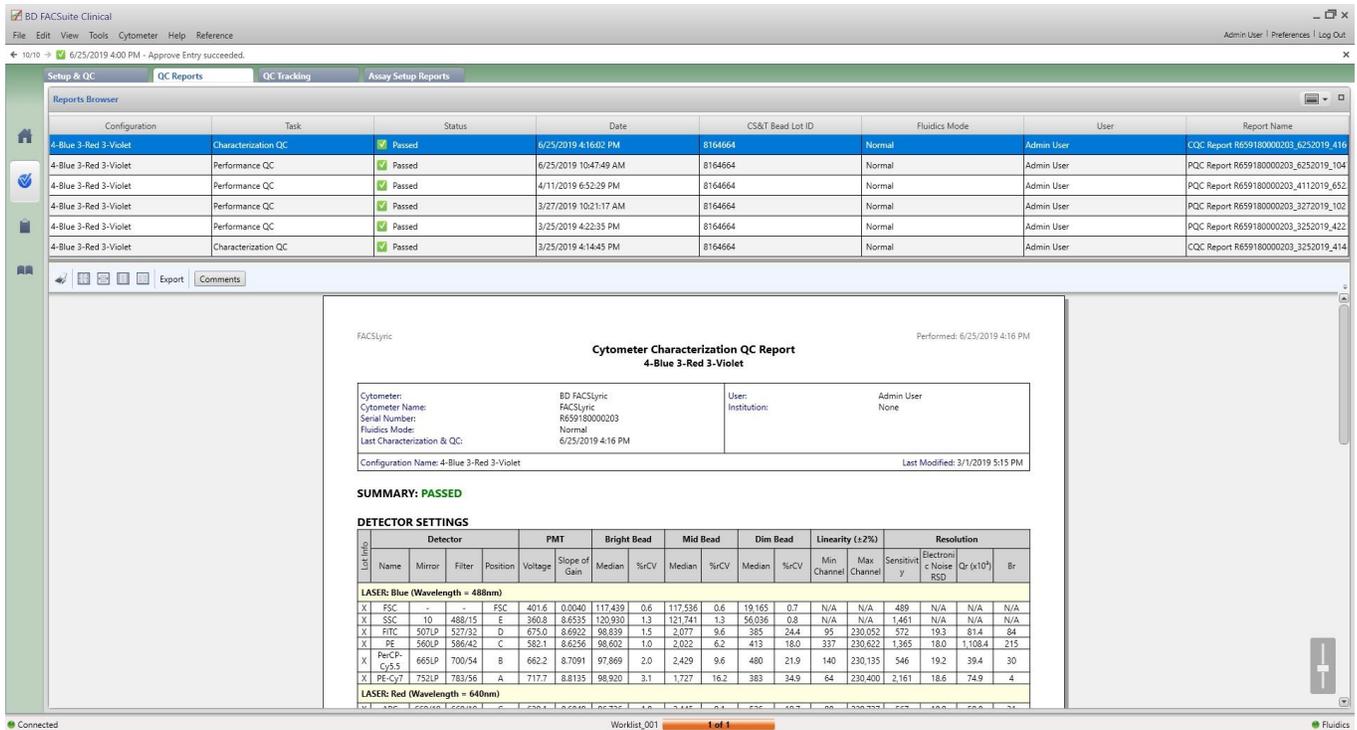


Figura 31: Software BD FACSSuite Clinical após a conclusão do Characterization QC

## Interpretação do Characterization QC Report (Relatório de Caracterizaçãodo QC)

Após a conclusão do **Characterization QC** (Caracterizaçãodo QC) os valores são automaticamente calculados de acordo com os valores alvos determinados pelo lote do CS&T, eles serão apresentados como na figura abaixo. Se todos os pontos do BD™ CS&T BEADS estiverem de acordo com as recomendações no Summary (Resumo) aparecerá a mensagem **PASSED (Passou)** em verde. Se qualquer um dos parâmetros que são avaliados durante o caracterização do equipamento for reprovado, a calibração será abortada e o relatório não será gerado. Caso seja reprovado e o relatório for gerado no **Summary** (Resumo) aparecerá a mensagem **FAILED (Falhou)** em vermelho. Desta maneira será necessário realizar alguns procedimentos antes de refazer o **Characterization QC** (Caracterizaçãodo QC).



**Cytometer Characterization QC Report**  
4-Blue 3-Red 3-Violet

Cytometer:	BD FACSLyric	User:	Admin User
Cytometer Name:	Julia	Institution:	None
Serial Number:	RZ6591800039		
Fluidics Mode:	Normal		
Last Characterization & QC:	6/8/2017 2:51 PM		
Configuration Name: 4-Blue 3-Red		Last Modified: 4/3/2017 4:16 PM	

**SUMMARY: PASSED**

Valores alvos das medianas e valores do % rCV

Valores de linearidade e sensibilidade

**DETECTOR SETTINGS**

Lot Info	Detector				PMT		Bright Bead		Mid Bead		Dim Bead		Linearity (±2%)			Resolution		
	Name	Mirror	Filter	Position	Voltage	Slope of Gain	Median	%rCV	Median	%rCV	Median	%rCV	Min Channel	Max Channel	Sensitivity	Electronic Noise RSD	Qr (x10 <sup>3</sup> )	Br
<b>LASER: Blue (Wavelength = 488nm)</b>																		
X	FSC	-	-	FSC	423.4	0.0040	120,533	0.6	120,635	0.6	19,912	0.6	N/A	N/A	568	N/A	N/A	N/A
X	SSC	10	488/15	E	442.0	8.3287	121,980	1.6	123,300	1.6	56,423	0.9	N/A	N/A	1,514	N/A	N/A	N/A
X	FITC	507LP	527/32	D	616.8	8.6613	101,118	1.6	2,663	9.2	438	26.7	126	229,625	422	19.5	77.3	160
X	PE	560LP	586/42	C	549.9	8.5635	100,910	1.2	2,626	6.3	498	18.8	155	229,944	1,290	18.2	636.8	142
X	PerCP-Cy5.5	665LP	700/54	B	579.2	8.7237	99,647	2.1	2,262	9.5	404	22.6	84	229,892	512	20.2	36.2	18
<b>LASER: Red (Wavelength = 640nm)</b>																		
X	APC	660/10	660/10	C	528.6	8.4813	101,205	1.7	2,805	8.0	494	19.6	170	228,756	568	19.3	52.5	21

**Figura 32:** Relatório da calibração da caracterização do QC

Como podemos ver no relatório acima, serão apontados os valores alvos determinado para as voltagens ótimas dos PMTs (Voltage), a mediana (Median) e o coeficiente de variação robusto (%rCV) das diferentes fluorescências das beads do BD™ CS&T Beads, além da linearidade (Linearity) e sensibilidade (Sensibility) do equipamento. Os valores obtidos no **Characterization** (Caracterização) serão utilizados como base para a avaliação de desempenho do equipamento no dia-a-dia.

**Performance QC (Desempenho do QC)**

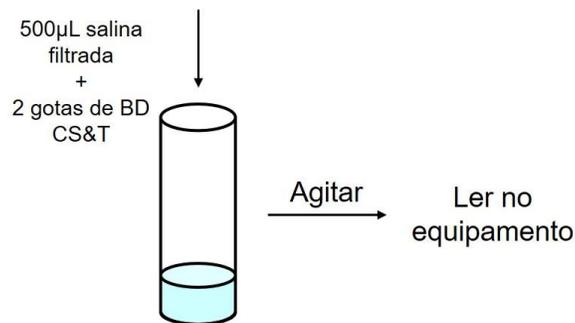
O objetivo do **Performance CQ** (Desempenho do QC (PQC)) é acompanhar o desempenho do citômetro ao longo dos dias. Durante esse procedimento o software verifica o alinhamento do laser, mede o percentual do coeficiente de variação robusta de uma população, linearidade, resolução e potência do laser. Comparar as tensões de PMT, coeficiente de variação robusta e linearidade com os valores estabelecidos durante o **Characterization QC** (Caracterização do QC). Atualiza diariamente a matriz de compensação e as PMTVs para as configurações de **LW e LNW**. Este é um procedimento executado diariamente pelos usuários.

O preparo do BD™ CS&T BEADS 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 o **Performance QC** (Desempenho do QC):

1. Separe e identifique um tubo de citometria
2. Homogeneíze o frasco de BD™ CS&T BEADS, 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 BD FACSTFlow™ filtrado e pingue 2 gotas de BD™ CS&T BEADS.
4. Homogeneíze o tubo num vórtex antes da utilização.
5. Faça a leitura no software do equipamento.



**Figura 33** : Preparo do BD™ CS&T BEADS, para o Performance QC

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

Para executar o Performance CQ (Desempenho do QC):

1. Abra o BD FACSSuite™ Clinical Software.
2. Na aba Setup & QC o resultado atual do **Performance CQ** (Desempenho do QC) e o tempo decorrido desde que o teste foi realizado são mostrados no canto superior direito. Este é um procedimento realizado **diariamente e tem validade de 24 horas**.
3. No **Task** (Tarefa) selecione **Performance QC** (Desempenho do QC).
4. Selecione o lote de esferas no menu BD™ CS&T Bead Lot (Lote de BD™ CS&T Beads).
  - a. O lote de esferas a ser utilizado é o número de lote impresso no tubo, não na caixa.
5. Execute as CS&T Beads, clicando em **Start** (Iniciar)



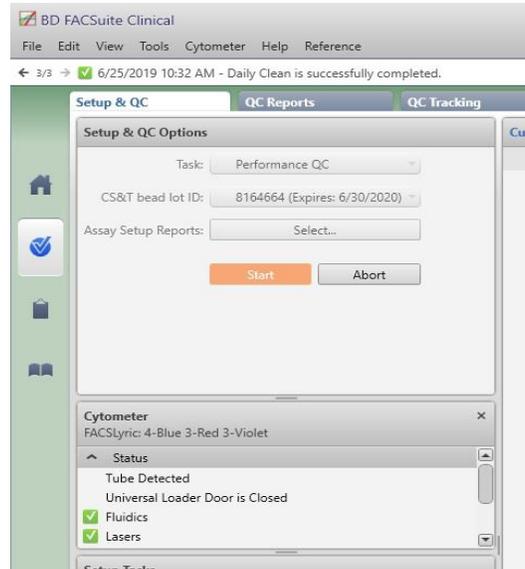


Figura 34: Software BD FACSuite Clinical para a execução do Performance QC

6. O software BD FACSuite exibe detalhes da tarefa no painel **Setup Tasks**. As marcas de verificação verdes, no canto inferior a esquerda, indicam a conclusão de um passo na tarefa.

# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+ BD FACSLyric™ – Módulo Básico

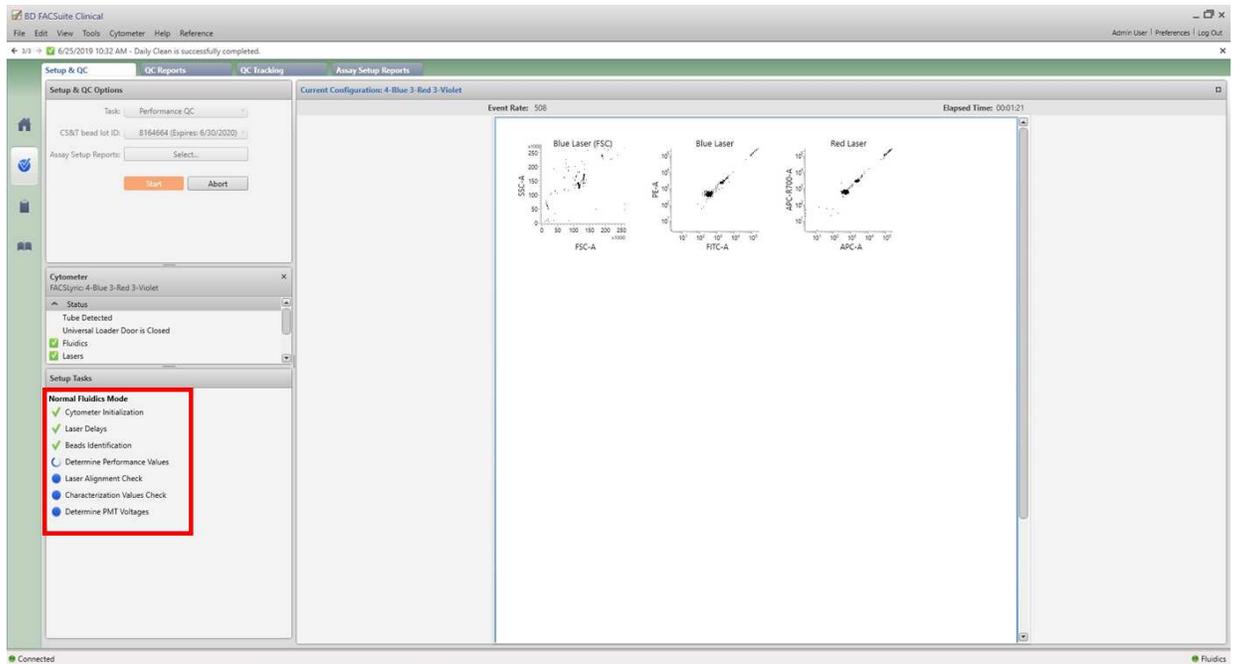


Figura 35: Software BD FACSuite Clinical durante a execução do Performance QC

7. Aguarde a conclusão da aquisição.
8. Quando a aquisição estiver concluída, clique em **Yes** e o Performance QC Report (Relatório de CQ) é exibido e os resultados são mostrados.

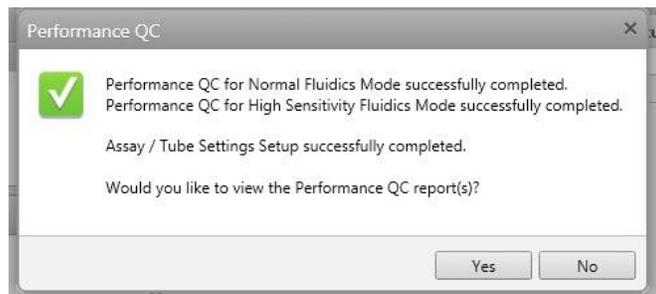


Figura 36: Caixa de Dialogo após conclusão do Performance QC

9. Após a aquisição, coloque um tubo com água destilada na probe.



### Interpretação do Performance QC Report (Relatório do desempenho do QC)

Após a finalização da calibração os valores do QC Report são automaticamente calculados e apresentados como nos relatórios abaixo. Os valores gerados após o Performance QC são comparados com os valores referência determinados no Characterization QC. Se qualquer um dos resultados para um parâmetro individual for reprovado, este será mostrado em vermelho e no **Summary** (Resumo) aparecerá uma mensagem de **FAILED (Falhou)** em vermelho na parte superior do relatório. Desta maneira, será necessário realizar alguns procedimentos antes de refazer o **Performance QC** (Desempenho do QC).

Performed: 4/18/2018 2:27 PM

**Cytometer Performance QC Report**  
4-Blue 3-Red 3-Violet

Cytometer: BD FACSLytic Cytometer Name: Serial Number: R659180000189 Fluidics Mode: High Sensitivity Last Characterization QC: 4/18/2018 2:00 PM	User: Service User Institution: None
Configuration Name: 4-Blue 3-Red 3-Violet	
Last Modified: 3/6/2018 9:43 AM	

Coeficiente de variação robusto (rCV) ≤ 6%  
 Δ PMTV ≤ 50      Linearidade ≤ 2%

**SUMMARY: PASSED**

**DETECTOR SETTINGS**

Lot Info	Detector				PMTV		Bright Bead		Linearity (±2%)		Resolution			
	Name	Mirror	Filter	Position	Actual	Δ	Median	% rCV	Min Channel	Max Channel	Sensitivity		Qr (x10 <sup>3</sup> )	Br
											Actual	% Diff		
<b>LASER: Blue (Wavelength = 488nm)</b>														
X	FSC	-	-	FSC	420.1	-7.0	119,968	16.7	N/A	N/A	14	-50	N/A	N/A
X	SSC	10	488/15	E	366.2	-2.3	115,201	2.7	N/A	N/A	1,749	-5	N/A	N/A
X	FITC	507LP	527/32	D	631.3	1.5	101,106	2.4	88	228,494	780	18	226.6	118
X	PE	560LP	586/42	C	565.8	1.3	101,178	2.3	133	233,876	1,798	4	2,187.3	224
X	PerCP-Cy5.5	665LP	700/54	B	661.5	-1.9	103,168	4.3	110	229,760	624	43	58.5	35
<b>LASER: Red (Wavelength = 640nm)</b>														
X	APC	660/10	660/10	C	651.1	0.6	97,805	2.4	100	229,159	752	9	69.5	18

Figura 37: Relatório da calibração do desempenho do QC

Como apontado em vermelho no relatório acima, o laudo final da calibração deve se encaixar em três condições que estão também mostradas abaixo:

1. A variação das voltagens dos PMTV (Δ PMTV) **DEVEM estar iguais ou menores que 50 em módulo**;
2. Os valores de % coeficiente de variação robusta de uma população das esferas de alto brilho (% Bright Bead rCV) para FITC, PE, PERCP Cy 5.5 e APC **DEVEM ser menores que 6%**;
3. A Linearidade do Instrumento (Linearity) para todos os parâmetros **DEVE ser igual ou menor a 2%**;



Se todos os pontos do BD™ CS&T BEADS estiverem de acordo com as recomendações acima, a mensagem no **Summary** do relatório estiver **PASSED (Passou)** em verde aparecerá no **Summary** (Resumo) do relatório. O equipamento estará então pronto para uso e a janela de controle de qualidade poderá ser então fechada. Um arquivo pdf com o relatório será gerado e automaticamente salvo. **Warnings** (Atenção) podem acontecer, porém esse alarme não é um critério de reprovação da calibração.

### Compensação

É o procedimento realizado para eliminar a sobreposição de espectros de emissão dos fluorocromos, permitindo que cada detector identifique somente uma fluorescência específica.

Para a compensação do BD FACSLytic™, utiliza-se o reagente chamado BD™ FC Beads. As BD™ FC Beads 7-Color Kit são fornecidas em uma caixa contendo 7 pacotes com 5 tubos cada, correspondente a cada um fluorocromos liofilizados (FITC, PE, PERCP-Cy5.5, PERCP, PE-Cy7, APC e APC-Cy7). Cada tubo tem uma mistura de esferas positivas e negativas. No BD FACSLytic™ os valores de compensação precisam ser medidos e atualizados a cada 60 dias.



**Figura 38:** BD™ FC Beads 7-Color Kit

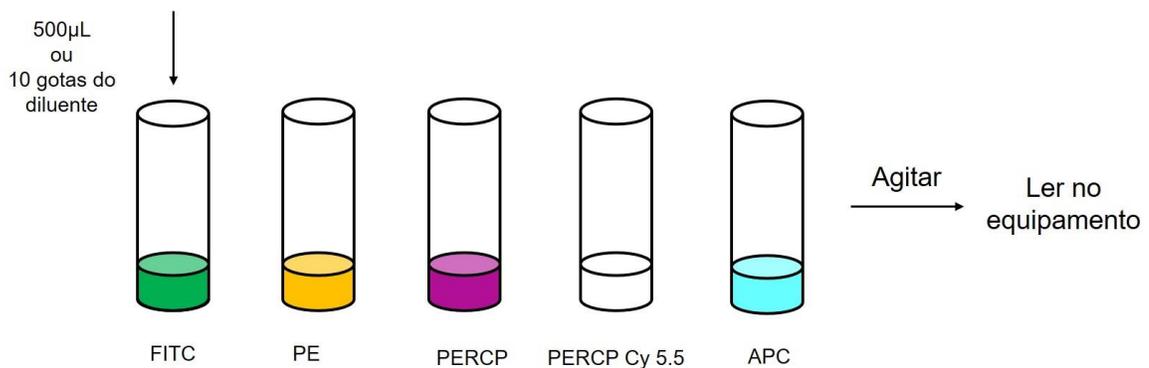
### Update reference setting (Atualizar das configurações padrões)

É o processo que recalcula e atualiza a matriz de compensação **LYSE WASH (LW)** E **LYSE NO WASH (LNW)** que foram previamente criadas durante a instalação do equipamento. Os valores de compensação gerados têm **validade de 60 dias**.



Para preparar as BD™ FC Beads 7-Color Kit para o **Update reference setting** (Atualizar as configurações padrões):

1. Separe um tubo de FC Beads de cada um dos fluorocromos **FITC, PE, PERCP-Cy5.5, PERCP, PE-Cy7, APC e APC-Cy7**
2. Mantenha os tubos em uma rack para que atinjam a temperatura ambiente, protegidos da luz.
3. Pipete 500µL ou 10 gotas do reagente de diluição contido no kit
4. Homogeneíze os tubos de FC Beads agitando-o em um vórtex à velocidade média durante 5–10 segundos.
5. Faça a leitura no software do equipamento.



**Figura 39** : Preparo do BD™ FC Beads, para o Update reference setting

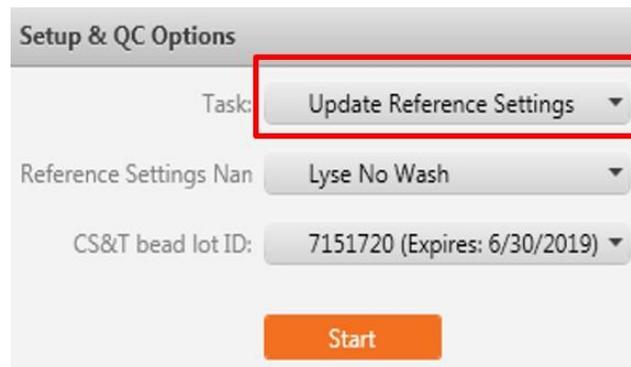
A BD recomenda que a atualização seja feita imediatamente após a ressuspensão das BD™ FC Beads, porém, caso isto não seja possível, o reagente deve ser mantido sob proteção da luz e armazenado por até quatro horas na geladeira (4°C a 8°C).

Para executar o Update reference setting (Atualizar as configurações padrões):

1. Navegue na aba do setup Setup & QC o resultado atual do Lyse Wash (LW) e Lyse No Wash (LNW) update e o tempo decorrido desde que o teste foi realizado são mostrados no canto superior direito. Este é um procedimento realizado a cada 60 dias.
2. Verifique se o Performance CQ (Desempenho do QC) passou.
3. Na tela Setup and QC Options:



- a. Selecione no Task Update Reference Settings (Atualizar as configurações padrões)
  - b. Selecione **LNW** como nome de Reference Settings Name (Nome da configuração padrão).
4. Verifique se CS&T bead lot ID está selecionado.
  5. Clique em Start (Iniciar).



**Figura 40:** Software BD FACSSuite Clinical para a execução do update reference setting

6. Uma janela que contém os tubos necessários para atualização dos valores compensação será aberta.

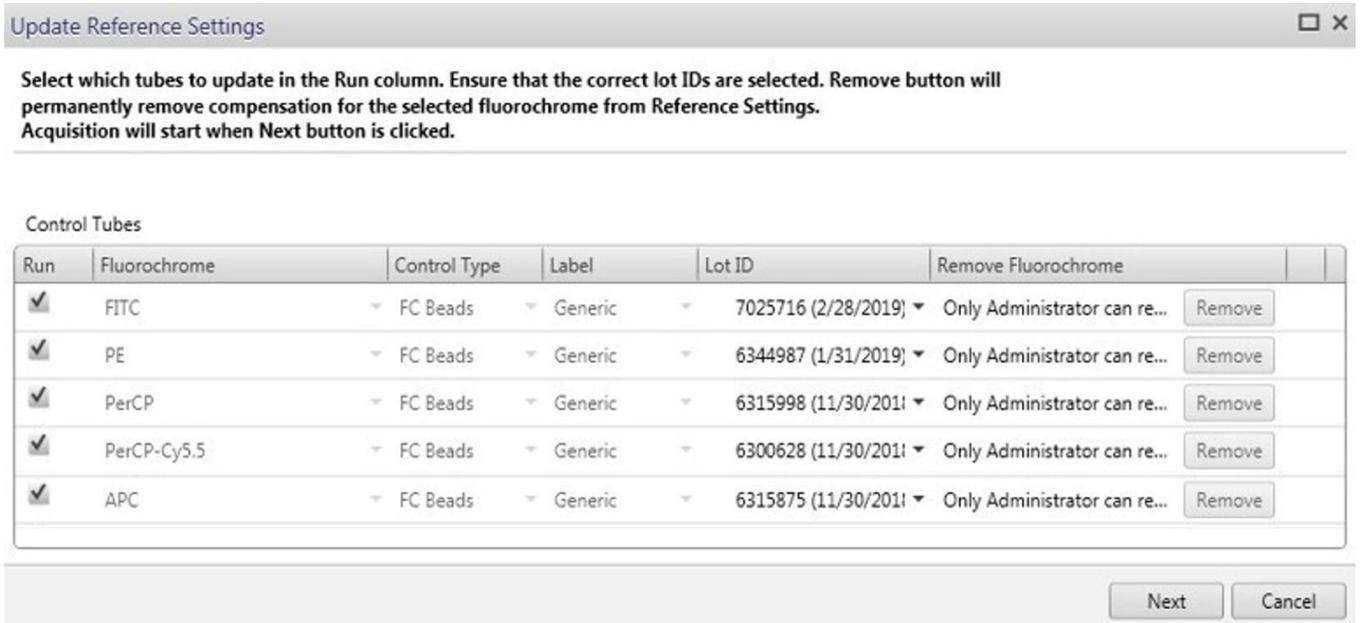


Figura 41 : Caixa de dialogo dos tubos das FC Beads para o Update reference setting

7. Verifique os seguintes pontos:
  - a. Os fluorocromos presentes na janela e os tubos das FC Beads preparados;
  - b. Conferir se os lotes das FC Beads estão corretos
8. Selecione **Next** (Próximo)
  - a. Com o tubo de CS&T utilizado para realizar Performance QC (Desempenho do QC) do dia, carregue-o na entrada manual de tubos.
  - b. Clique Continue (Continuar)
  - c. **CHECKS** em verde aparecerá após a aquisição completa do CS&T
9. Em seguida continue adquirindo os tubos de FC Beads preparados
10. Selecione **Finish** (Terminar)

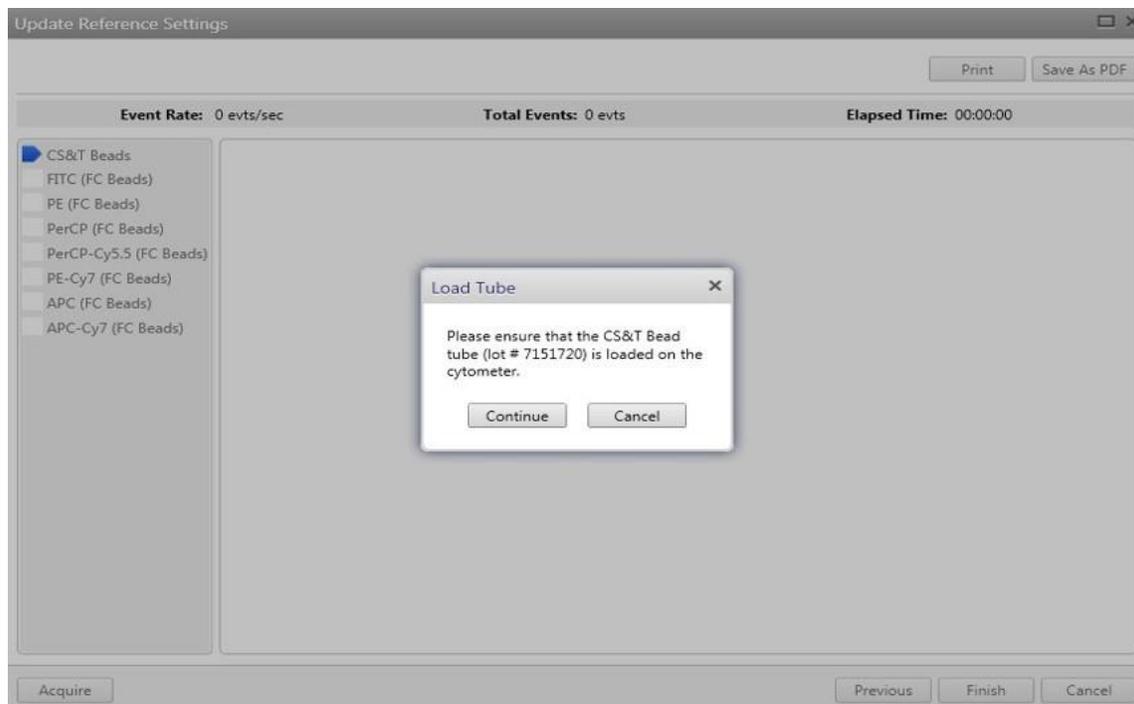


Figura 42 : Caixa de diálogo durante a execução do Update reference setting

Após a aquisição dos tubos das FC Beads o software realizará o cálculo da matriz de compensação LNW e o equipamento estará pronto para iniciar a rotina CD4/CD8.

Resumo dos procedimentos de controle de qualidade do equipamento:

<b>Procedimento</b>	<b>Função</b>	<b>Reagente necessário</b>	<b>Periodicidade</b>
<b>Characterization QC</b>	Caracteriza e estabelece os valores alvos inicial do equipamento	BD™ CS&T BEADS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A cada seis meses,</li> <li>• Após troca de lote do CS&amp;T ou</li> <li>• Após intervenção da equipe de engenharia no equipamento.</li> </ul>
<b>Performance QC</b>	Avalia a performance do equipamento	BD™ CS&T BEADS	Diariamente
<b>Update reference setting</b>	Atualiza a matriz de compensação Lyse-Wash e Lyse no Wash	BD™ FC Beads	A cada 60 dias (2 meses)

### Instalação de um novo lote de esferas

Se esta for a primeira vez em que você está processando um lote de esferas, CS&T ou FC Beads será necessário instalar os arquivos com os lotes que são disponíveis no site da BD. O arquivo do lote de esferas contém informações específicas do lote de esferas, como data de validade, %rCV, MFIs alvo e especificações de sensibilidade.

Para baixar as informações de um novo lote de BD™ CS&T BEADS ou BD™ FC Beads:

1. Em um computador com acesso a internet, acesse o site da BD Europa: [www.bdbiosciences.com/en-eu](http://www.bdbiosciences.com/en-eu)
2. Selecione **Biosciences > Instrument > Clinical Instrument > Clinical Software > Flow Cytometer Acquisition > BDFACSSuite Clinical Software**



# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

## BD FACSLyric™ – Módulo Básico

The screenshot shows the BD website navigation. The top navigation bar includes 'Biosciences', 'Instruments', 'Reagents', 'Applications', and 'Support'. A search bar is located on the right. Below this, a secondary navigation bar highlights 'BD FACSuite™ Clinical Software'. The main content area features a large teal banner with the text 'BD FACSuite™ Clinical Software'. Below the banner, a horizontal menu contains 'Overview' and 'FACSLyric', with 'FACSLyric' selected and highlighted by a red box. A 'Contact Us' button is visible on the right. Below this, another horizontal menu shows 'Overview', 'Resources', and 'Bead Lot Files', with 'Bead Lot Files' selected and highlighted by a red box. The page content includes a heading 'BD FACSLyric™ Clinical Bead Lot Files' and two bullet points: 'BD™ CS&T Installation Instructions' and 'BD™ FC Installation Instructions'. A table is displayed below, with a red box highlighting the 'Name' and 'Bead Lot Files' columns. The table has four columns: Name, Bead Lot Files, Status, and Part Number.

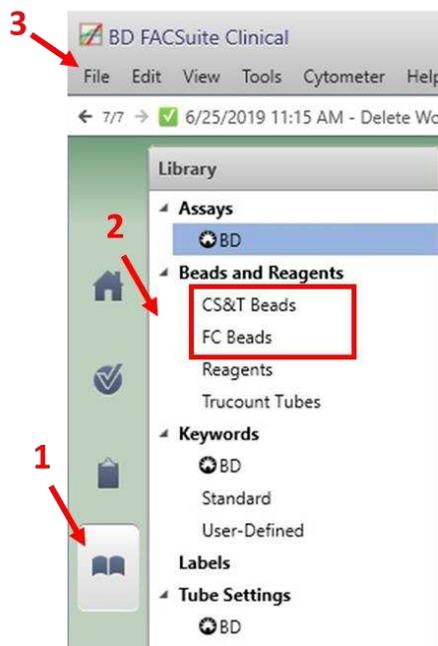
Name	Bead Lot Files	Status	Part Number
BD™ CS&T When running a BD FACSLyric™ 12-color CE-IVD instrument, we recommend using lot 9051880 or newer. This new lot of beads, and all future lots, have been optimized for the 12-color instrument.	910898_9093951	CE-IVD	656504 (50 Tests) 656505 (150 Tests)
	910898_9063854		
	910898_9051880		
	910898_8164664		
	910898_7298995		
	910898_7235842		
	910898_7151720		
	910898_7081518		
910898_7054750			
BD™ FC Beads 7-Color Kit When running a BD FACSLyric™ 12-color CE-IVD instrument, we recommend using lot 831066 or newer. This new lot of beads, and all future lots, have been optimized for the 12-color instrument.	656867_9094902	CE-IVD	656867
	656867_9021747		
	656867_8310666		
	656867_8236653		
	656867_8235690		
	656867_8187657		
	656867_8149975		
656867_8079519			

Figura 43: Passo-a-passo para busca dos lotes de esferas CS&T e FC Beads no site da BD

3. Baixe o arquivo de lote necessário.
4. Transporte os arquivos de lotes para o computador conectado ao BD FACSLyric™ e coloque-o no local desejado.



5. Abra o BD FACSSuite™ Clinical Software.
6. Clique na aba **Library** (Biblioteca) no lado esquerdo.
7. Selecione a opção **Beads and Reagents** (Beads e Reagentes) **no** menu do lado esquerdo.
8. Clique em CS&T ou FC Beads
9. Clique em **File** (Arquivo) > **Import** (Importar). Localize o arquivo de lote de esferas que você baixou em seu computador e clique em **Open** (Abrir).



**Figura 44** : Software BD FACSSuite Clinical para inserção dos lotes de CS&T e FC Beads na biblioteca

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 Characterization CQ.

**EXERCÍCIOS 4**

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

---

---

---

2. Quais são as etapas de calibração do BD FACSLyric™? E quando ela deve ser realizadas?

---

---

---

---

---

---

---

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

---

---

---

---

---

---

4. Qual é o reagente utilizado para a compensação do BD FACSLyric™? O que o compõe? Como prepará-lo?

---

---

---

---

---

---



5. O que é compensação?

---

---

---

---

---

6. Quando devemos realizar a compensação do BD FACSLyric™?

---

---

6. Onde adicionar os lotes das esferas utilizadas no BD FACSLyric™?

---

---



### 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<sub>2</sub> ou K<sub>3</sub>. Após a coleta, o sangue deve ser utilizado para a preparação da amostra em até 48 horas, desde que este sangue tenha sido mantido em temperatura ambiente (20°C a 25°C) e sem agitação. O protocolo que deve ser utilizado na preparação das amostras é o que foi preconizado pelo fabricante do reagente utilizado para a marcação das células (BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC).

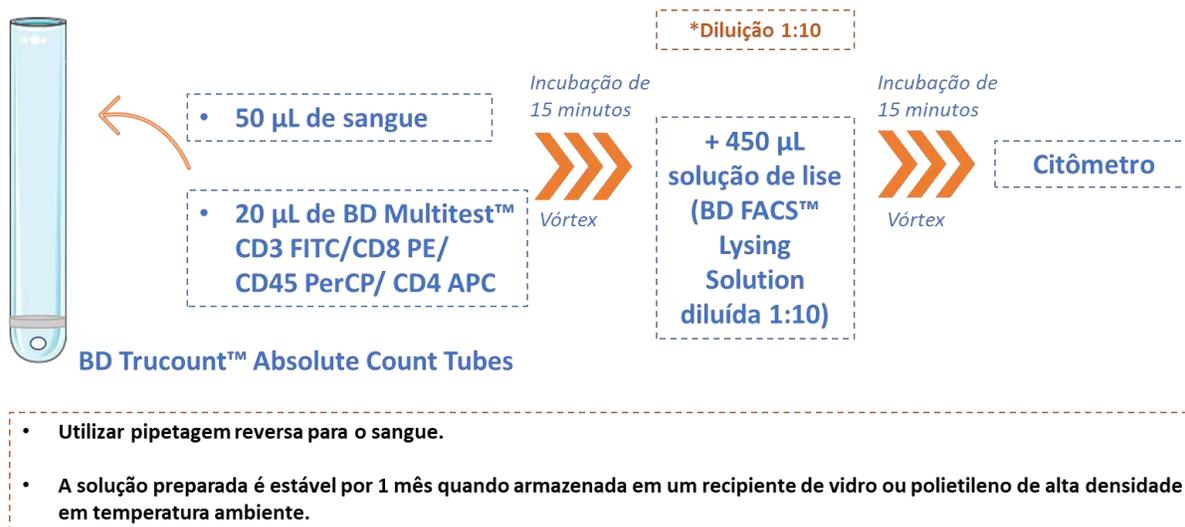


Figura 45: Preparo de amostra.

### Preparação das amostras

Etapa 1 - Adicionar o reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC aos BD Trucount™ Absolute Count Tubes As amostras para quantificação de CD4/CD8 são processadas em tubos denominados BD Trucount™ Absolute Count Tubes. Nesses tubos, existe um grupo (*pellet*) de beads fluorescentes responsáveis por gerar as contagens celulares absolutas em cada amostra. Por isso, antes de se pipetar o BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC™ dentro dos tubos, é muito importante verificar a integridade do *pellet* de beads. O BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC™ é o reagente que



contém uma mistura de anticorpos anti-CD3 conjugados ao FITC, anticorpos anti-CD8 conjugados ao PE, anticorpos anti-CD45 conjugados ao PerCP e anticorpos anti-CD4 conjugados ao APC. O BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC™ deve ser pipetado (20µL) nos BD Trucount™ Absolute Count Tubes com cuidado para que a ponteira não toque no *pellet* de beads. Quando o reagente toca as beads, elas são solubilizadas.

#### Etapa 2 - Pipetar o sangue.

O volume de sangue utilizado é 50µL e deve ser pipetado por **pipetagem reversa** (pipetagem utilizada para líquidos viscosos). Antes da pipetagem do sangue, o tubo de amostra deve ser bem homogeneizado e isso pode ser feito manualmente, agitando o tubo dez vezes por inversão ou ainda mantendo o tubo em agitador automático, porém nesse caso, o tempo de agitação não deve ultrapassar 10 minutos. Após, a pipetagem do sangue, os tubos devem ser agitados em vórtex leve e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C) e sob o abrigo da luz.

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

Após os 15 minutos de incubação, 450µL da solução de lise (BD FACS™ Lysing Solution ) já diluída 1:10 em água destilada deve ser adicionada ao tubo. A solução de lise (diluída ou concentrada) não requer proteção da luz nem refrigeração e, após diluída, deve ser utilizada em até um mês desde que conservada em frasco de vidro limpo. Se a solução for armazenada em frascos de plásticos, o ideal é que sejam feitas diluições semanais. Depois deste procedimento, o tubo deve ser homogeneizado e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C) sob o abrigo da luz.

#### Etapa 4 - Leitura no BD FACSLyric™.

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).**

### **Preparação dos Controles**

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



No preparo dos controles adicionamos 50µL de sangue por *pipetagem reversa*, seguida da adição de 450µL de BD FACS™ Lysing Solution. Após isso cada bead deve ser adicionada em seu tubo correspondente (*pipetagem reversa*). Assim teremos um tubo para o controle alto, um tubo para o controle médio e um tubo para o controle baixo. Antes da pipetagem, os frascos dos BD Trucount™ Control Beads devem ser vortexados gentilmente por 30 segundos. Após a adição dos controles, os tubos 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 eles devem ser analisados utilizando-se as Regras de Westgard.

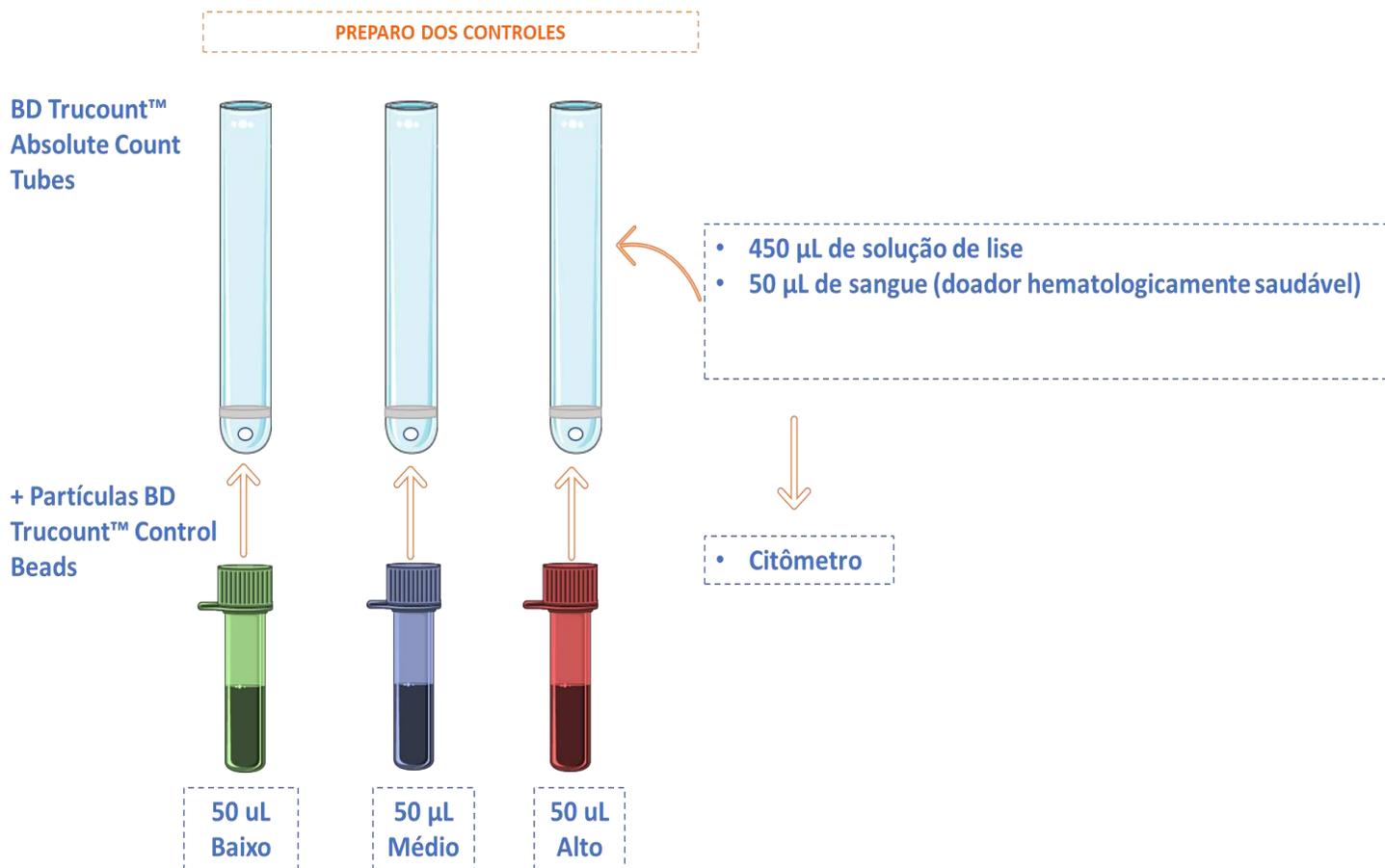


Figura 46: Preparo dos tubos de BD Trucount™ Control Beads

## BD FACSuite Clinical e Aquisição de amostras

Após a realização do Performance QC com o BD™ CS&T Beads o equipamento está pronto para uso. Os próximos passos serão: Inserir as informações do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, BD Trucount™ Absolute Count Tubes e BD Trucount™ Control Beads, criar a lista de trabalho (Worklist) para a leitura das amostras, a aquisição das amostras, ajuste dos gates e interpretação do Lab Report.

### Preparação da Library:

1. Após abrir o BD FACSuite Clinical, selecione o ícone **Library** (Biblioteca) no canto esquerdo da tela.

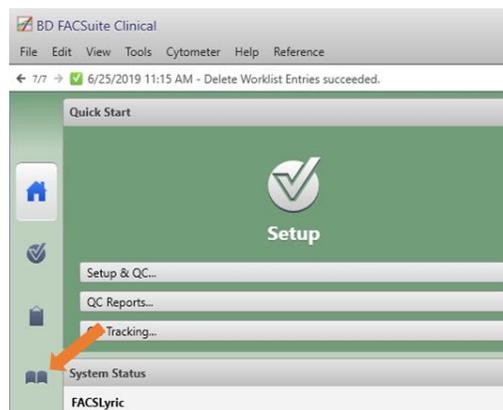


Figura 47: Library

2. Na coluna **Library**, expanda a opção **Beads and Reagents** (Beads e Reagentes) e clique em **Reagents** para inserir o lote e a validade do BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3/CD8/CD45/CD4 e dos BD Trucount™ Control Beads LOW, MEDIUM e HIGH.

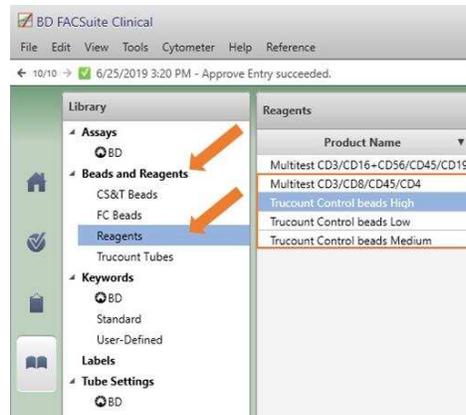


Figura 48: Reagents

- a. Para inserir o lote do BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, clique em *BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3/CD8/CD45/CD4*. Na janela **BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC CD3/CD8/CD45/CD4**, clique no botão **Add Lot** (Adicionar Lote). Na janela **Add New Lot** (Adicionar novo lote), insira o número do lote do BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC no campo *Lot ID*, e a data de validade em *Expiration Date* (Data de expiração). Marque a caixa *Current Lot* (Lote atual) para indicar que é o lote em uso pelo laboratório, e clique em **OK** para salvar.

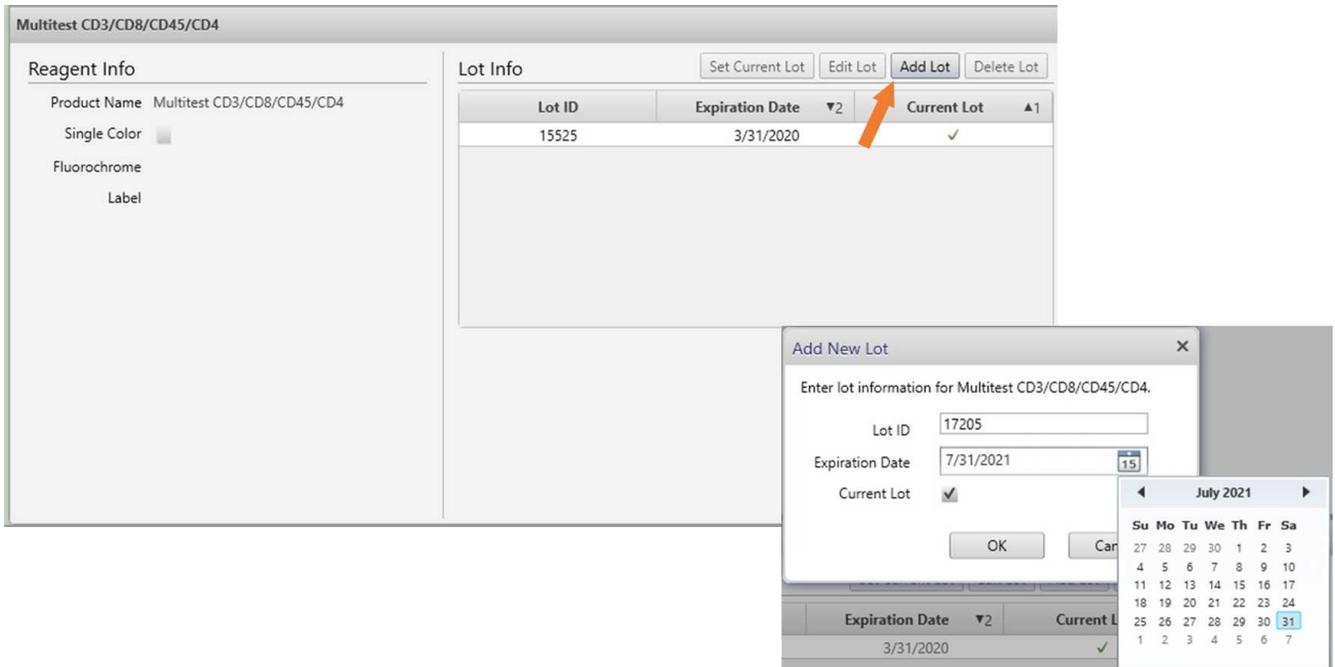


Figura 49: Add New Lot

- b. Para inserir o lote dos BD Trucount™ Control Beads, clique em *BD Trucount™ Control Beads High, Medium* ou *Low* (Beads do Controle Trucount Alto, Médio ou Baixo) para inserir a informação do respectivo controle. Na janela **BD Trucount™ Control Beads**, clique no botão **Add Lot**. Na janela **Add New Lot**, insira o número do lote do BD Trucount™ Control Beads no campo *Lot ID*, e a data de validade em *Expiration Date*. Marque a caixa *Current Lot* para indicar que é o lote em uso pelo laboratório, e clique em *OK* para salvar. Repita o procedimento para os 3 controles, *Low, Medium* e *High*.

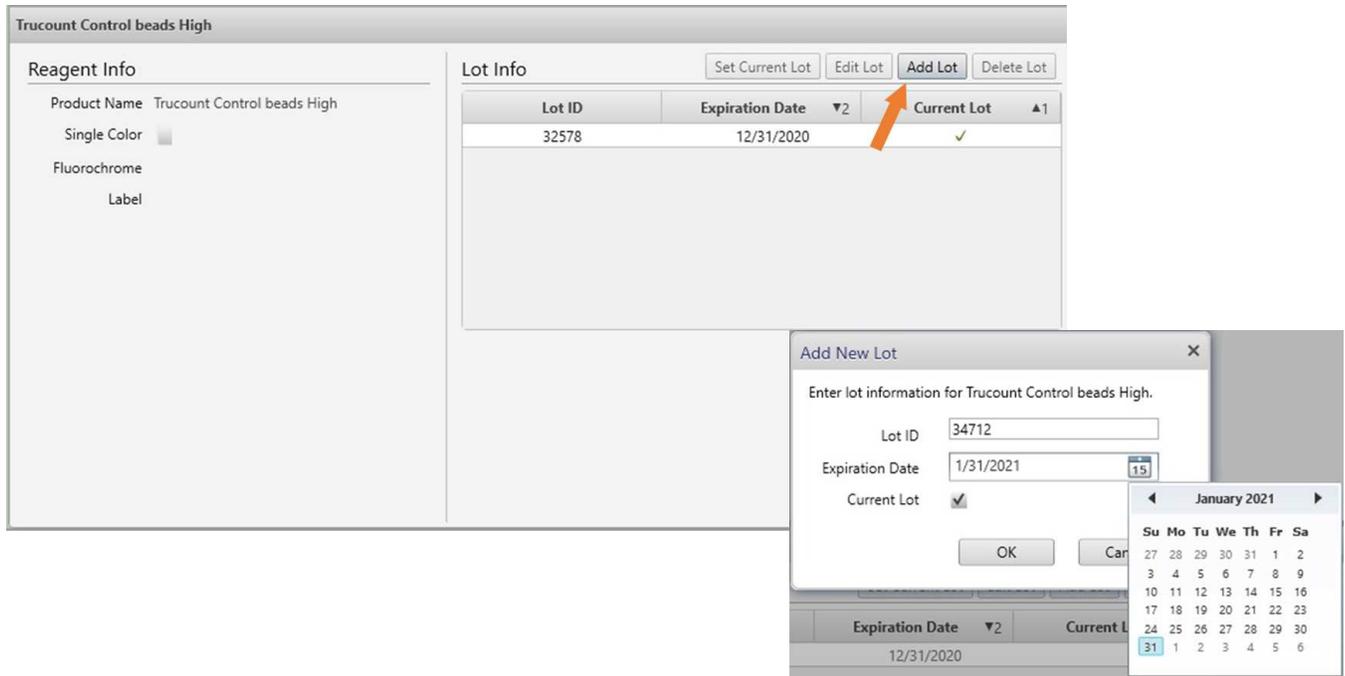


Figura 50: Trucount control beads High

- c. Para alterar o lote entre as opções já salvas no software, selecione o lote do reagente e clique em **Set Current Lot** (Definir o Lote Atual). O lote selecionado será marcado com um ✓ na coluna **Current Lot** (Lote Atual).

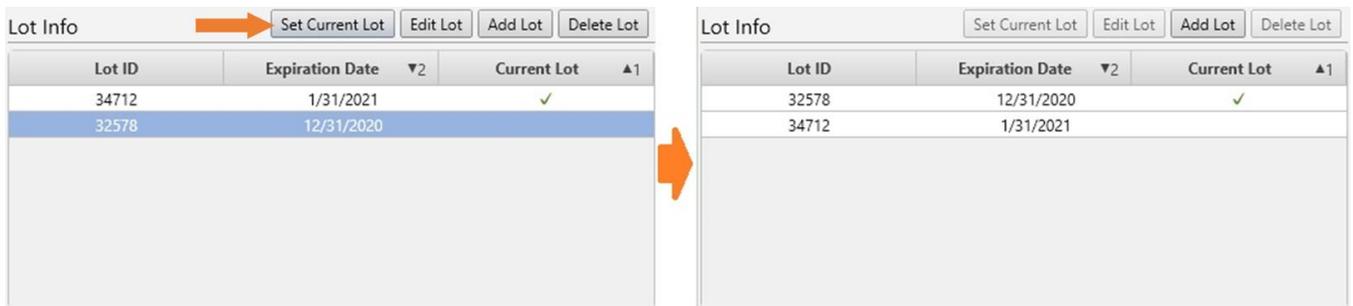


Figura 51: Lot info

3. Ainda na opção **Beads and Reagents**, clique em **Trucount Tubes** (Tubos Trucount) para inserir o lote e a validade do BD Trucount™ Absolute Count Tubes.



- a. Para inserir o lote do BD Trucount™ Absolute Count Tubes, clique em **Add** na janela **Trucount Tube Lots**. Na janela **Trucount Tube Lot**, insira o número do lote do BD Trucount™ Absolute Count Tubes no campo *Lot ID*, a data de validade em *Expiration Date* e o número de beads do pellet em *Beads / Pellet*. Marque a caixa *Current Lot* (Lote atual) para indicar que é o lote em uso pelo laboratório, e clique em **OK** para salvar.

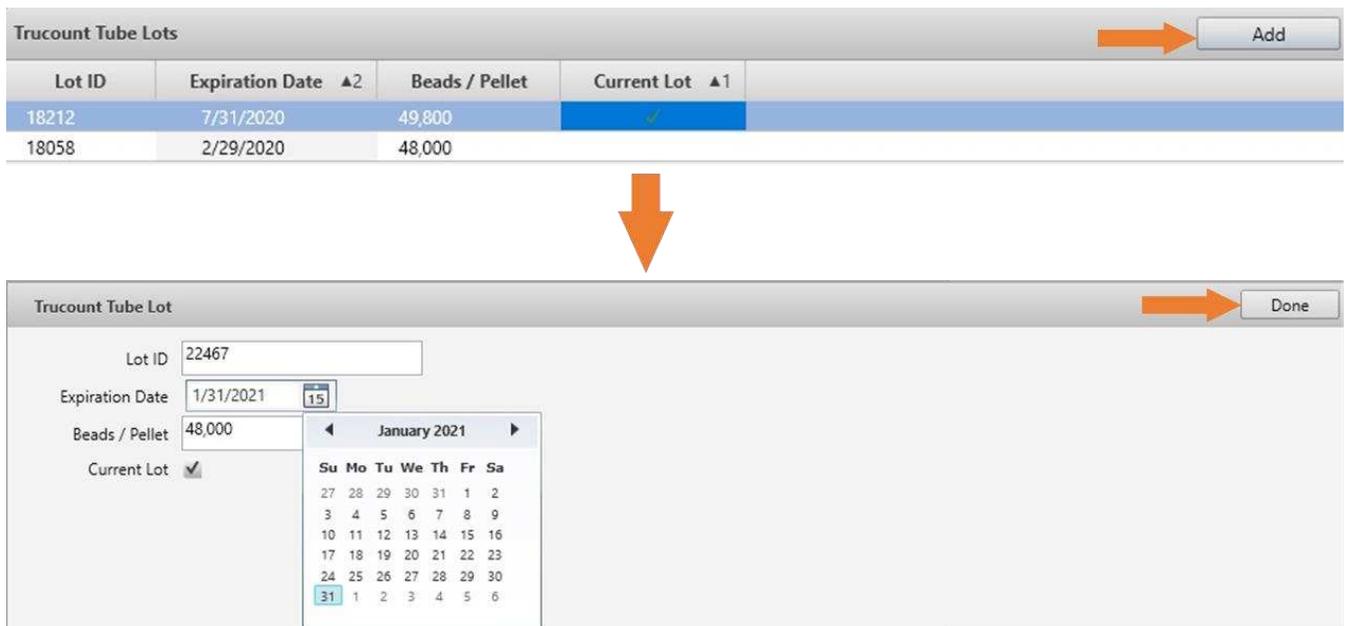
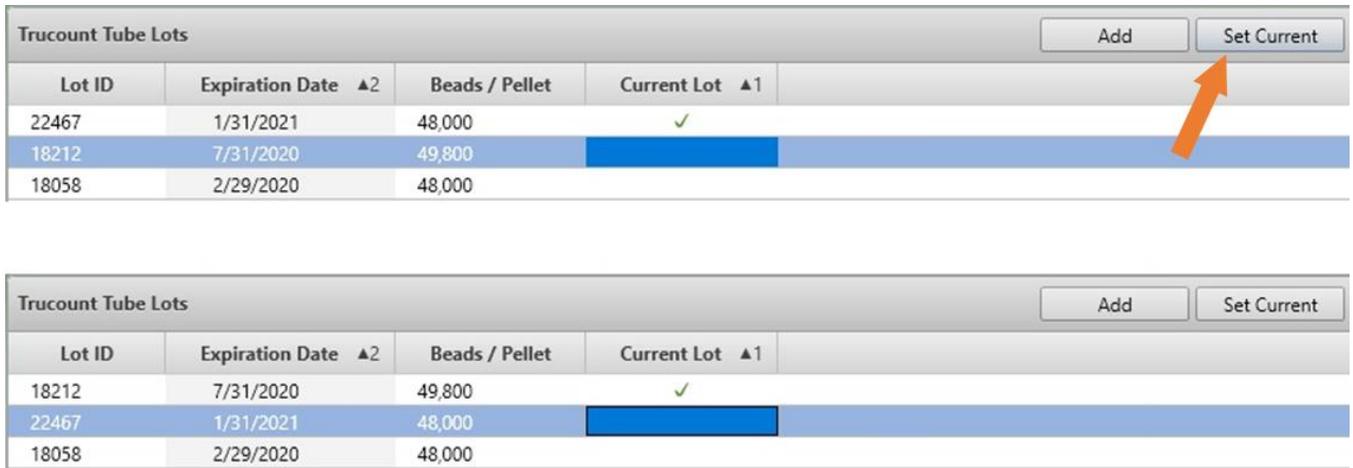


Figura 52: Trucount Tube Lots

- b. Para alterar o lote entre as opções já salvas no software, selecione o lote do reagente e clique em **Set Current**. O lote selecionado será marcado com um ✓ na coluna **Current Lot**.



Lot ID	Expiration Date ▲2	Beads / Pellet	Current Lot ▲1
22467	1/31/2021	48,000	✓
18212	7/31/2020	49,800	
18058	2/29/2020	48,000	

Lot ID	Expiration Date ▲2	Beads / Pellet	Current Lot ▲1
18212	7/31/2020	49,800	✓
22467	1/31/2021	48,000	
18058	2/29/2020	48,000	

Figura 53: Set Current

### Configuração dos arquivos salvos:

1. Inicialmente, verifique se o equipamento está Connected (conectado) e com os níveis de solução nos reservatórios adequados para a aquisição das amostras.

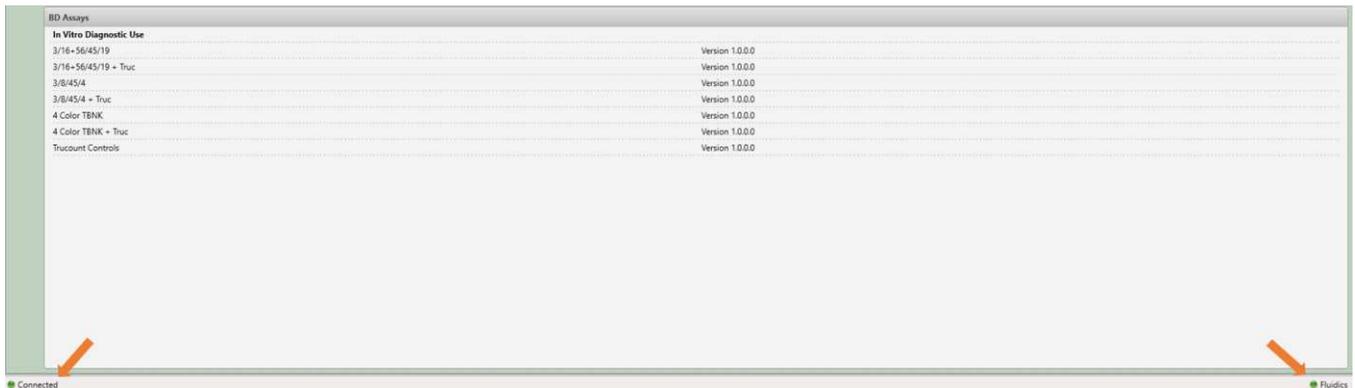


Figura 54: BD Assays

2. Na parte superior da janela, clique em **Tools > Preferences** (Ferramentas > Preferências) para configurar quais arquivos devem ser salvos:



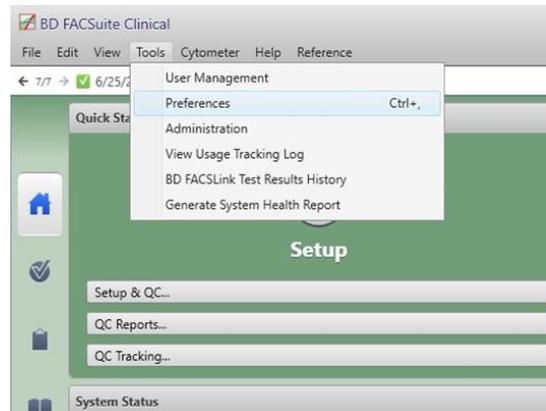


Figura 55: Preferences

- a. Clique na aba **Worklists** (Listas de trabalho) e selecione **Entry Run Package**. Na opção **Auto Export Options** (Opções de exportação automática), marque as opções *Export entry run package after acquisition* (Exportar a lista de trabalho com os resultados após a aquisição) e *Create dated subfolder (yyyymmdd)* (Criar subpasta do dia no formato ANO.MÊS.DIA). Isso criará uma pasta do dia no diretório **C:\BD Export Clinical\ERP\Worklists**, que está indicada no campo **Location** (Localização), e salvará a worklist analisada com os resultados dos pacientes.
- b. Na opção **Naming Format**, selecione *Sample ID* (Identificação da amostra) na primeira caixa e *Task Name* (Nome do teste) na segunda caixa. Selecione *None* (Nenhum) para a terceira e quarta caixas. Isso determinará o nome dado à lista de trabalho exportada ao final da rotina.

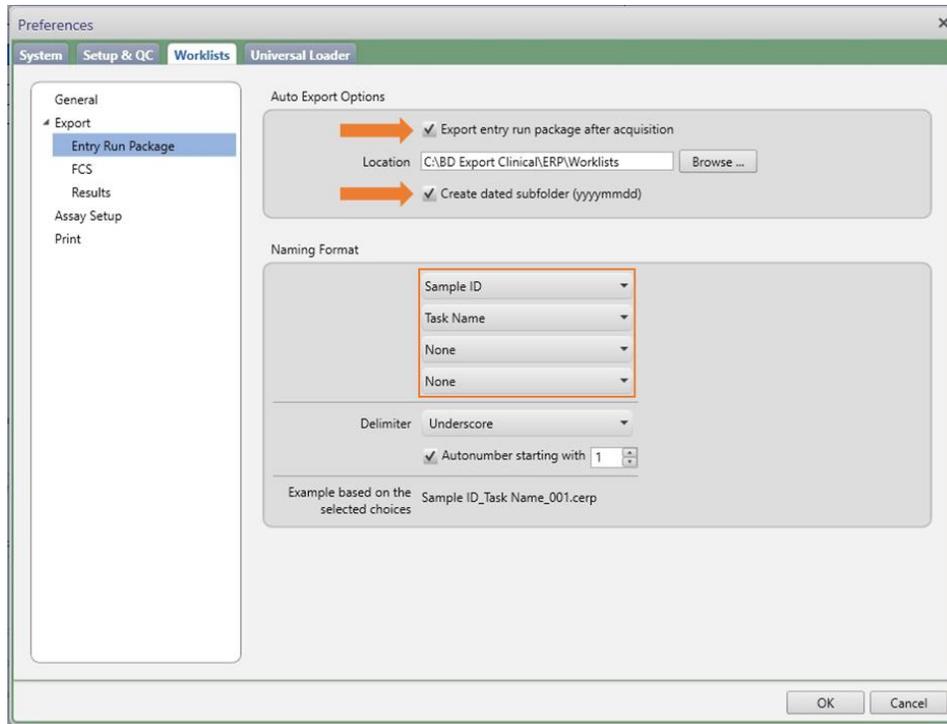


Figura 56: Auto Export Options

- c. Selecione **FCS**. Na opção **Auto Export Options**, marque as opções *Export FCS after acquisition* (Exportar FCS após a aquisição) e *Create dated subfolder (yyyyymmdd)* (Criar subpasta do dia no formato ANO.MÊS.DIA). Isso criará uma pasta do dia no diretório **C:\BD Export Clinical\FCS\Worklists**, que está indicada no campo **Location**, e salvará os arquivos das análises dos pacientes no formato *.fcs*.
- d. Na opção **Naming Format**, selecione *Sample ID* (Identificação da amostra) na primeira caixa e *Task Name* (Nome do teste) na segunda caixa. Selecione *None* (Nenhum) para a terceira e quarta caixas. Isso determinará o nome do arquivo de cada paciente analisado.

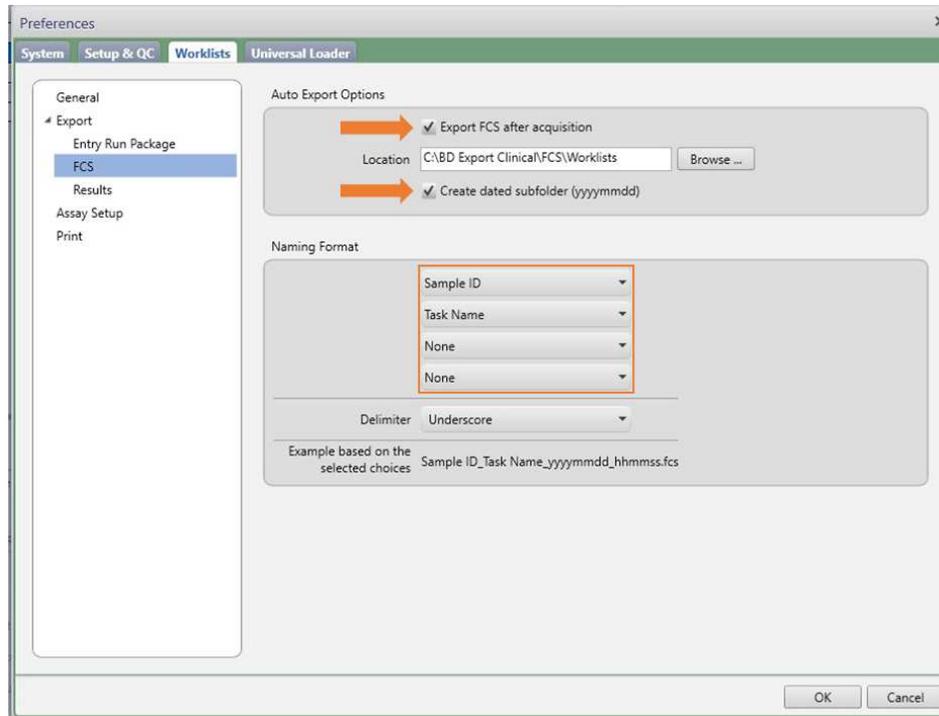


Figura 57: FCS

- e. Selecione **Results** (Resultados). Na opção **Auto Export Options**, marque as opções *Automatically export results* (Exportar os resultados automaticamente) e *Create dated subfolder (yyyyymmdd)* (Criar subpasta do dia no formato ANO.MÊS.DIA). Isso criará uma pasta do dia no diretório **C:\BD Export Clinical\Results\Worklists**, que está indicada no campo **Location**, e salvará o arquivo de exportação que será transferido para o Siscel.

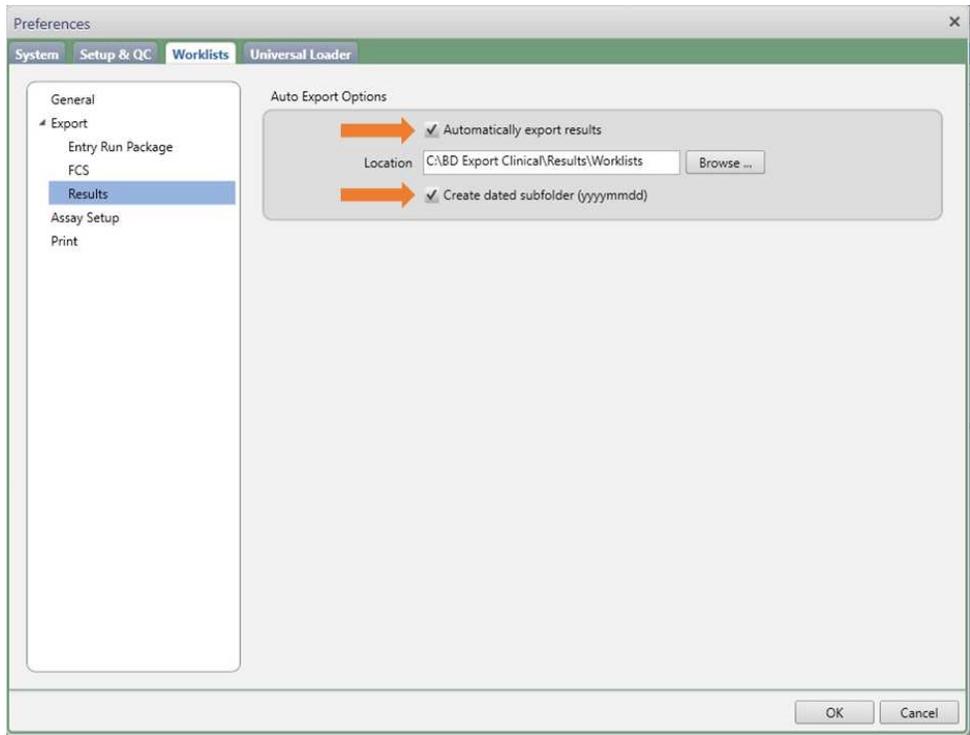


Figura 58: Results

### Preparação da lista de trabalho:

1. Na tela inicial do FACSuite Clinical, selecione a opção **Worklist** no canto esquerdo da tela.

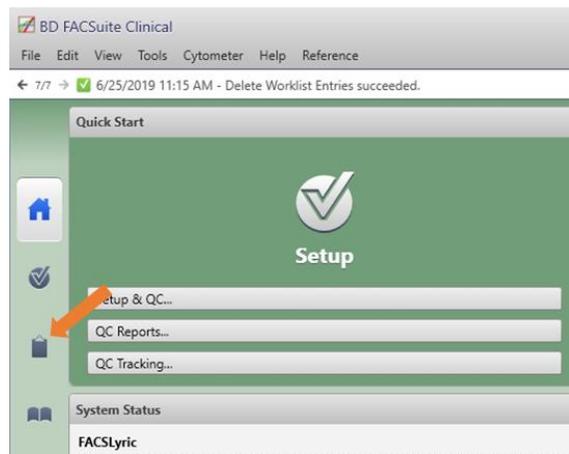


Figura 59: Manage Worklists



2. Selecione a aba **Manage Worklists** (Gerenciar Listas de Trabalho) e clique em **New** (Novo) para criar uma nova Worklist. Será aberta uma nova aba para configuração da Worklist.

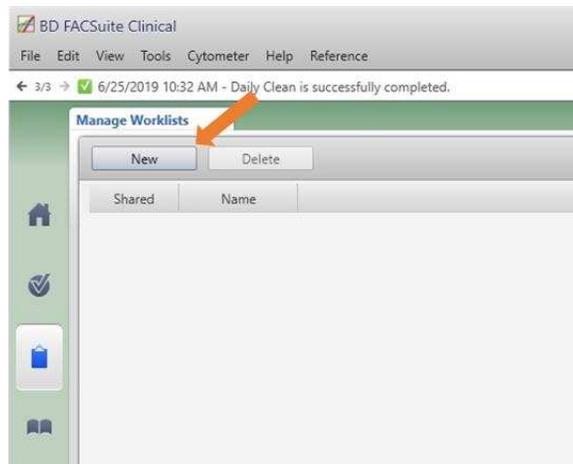


Figura 60: New

3. Na janela **Loading Options** (Opções de carregamento), confirme se a opção **Loading Option** está marcando *Manual*.

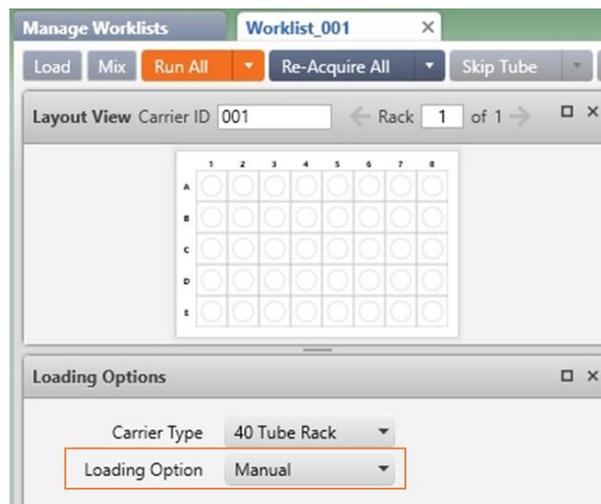
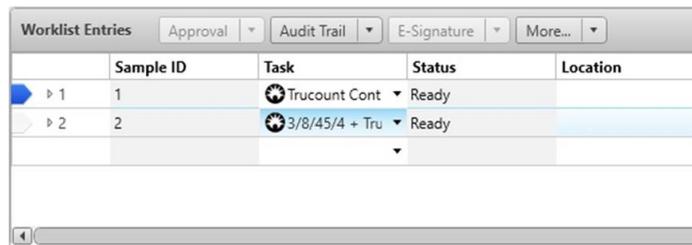


Figura 61: Loading Option

4. Na janela **Worklist Entries** (Entradas da Lista de Trabalho), preencha a coluna **Sample ID** (Identificação da Amostra) com o número de identificação dos tubos do controle TruCOUNT, e selecione a opção *BD Trucount™ Control Beads* na coluna **Task** (Tarefa).
5. Ainda na janela **Worklist Entries**, preencha a coluna **Sample ID** com o número de identificação do paciente, e selecione a opção *3/8/45/4 + Truc* na coluna **Task**. Repita esse procedimento para cada paciente adicionado na Worklist.



	Sample ID	Task	Status	Location
▶ 1	1	Trucount Cont	Ready	
▶ 2	2	3/8/45/4 + Tru	Ready	

Figura 62: Worklist Entries

6. Para facilitar a identificação da Worklist, altere o seu nome após inserir as informações dos pacientes. Na barra de ferramentas, clique em **File > Rename** para abrir a janela **Rename Worklist**. Altere o nome para a data do dia, no formato ANO.MÊS.DIA (por exemplo, 20190626).
7. A Worklist ficará salva automaticamente na aba **Manage Worklists**.

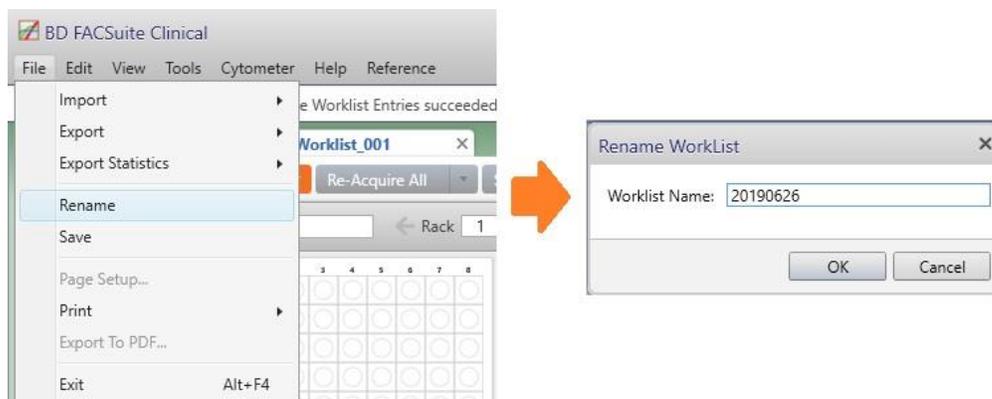


Figura 63: Rename Worklist

**NOTA:** As informações sobre os lotes do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC, BD Trucount™ Absolute Count Tubes e BD Trucount™ Control Beads, além do pellet de beads do BD Trucount™ Absolute Count Tubes serão carregados automaticamente da **Library**, mas não aparecerão na Worklist. Antes de preparar a Worklist, confirme se os reagentes utilizados no dia estão corretamente cadastrados e selecionados na **Library** (Ver o tópico **Preparar a Library** na página 68).

### Aquisição das amostras:

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

1. Selecione a primeira amostra da Worklist na janela **Worklist Entries**. Ela ficará com uma seta **AZUL** à sua esquerda. Clique em **Run All** (Adquirir Todos).

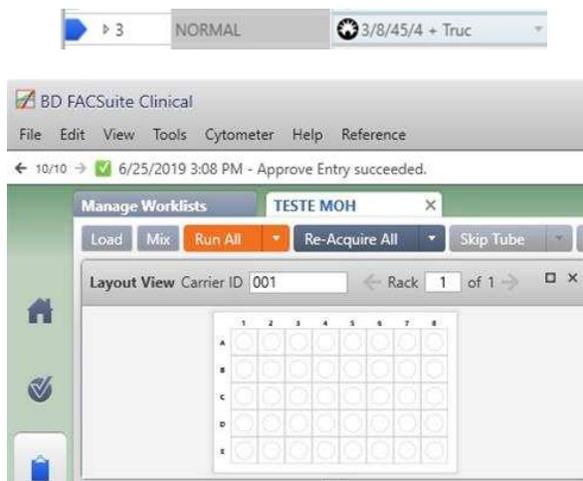


Figura 64: Run all

2. A caixa de diálogo **Worklist Acquisition Run** será aberta. Ela mostrará **Warnings** (Avisos) caso seja necessário realizar alguma ação corretiva no equipamento, e **Informational** com o **Lot ID** do BD Trucount™ Absolute Count Tubes utilizado.

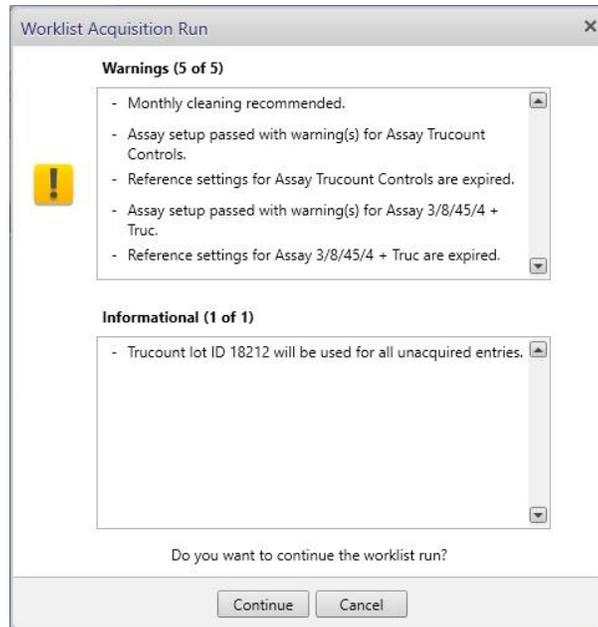


Figura 65: Worklist Acquisition Run

- a. Clique em **Cancel** (Cancelar) caso precise realizar algum procedimento corretivo ou alterar o(s) lote(s) do(s) reagentes.
- b. Clique em **Continue** (Continuar) para seguir com a aquisição da amostra. Será aberta a janela **Load Tube** (Carregue o Tubo) solicitando que o tubo da amostra seja encaixado na probe.

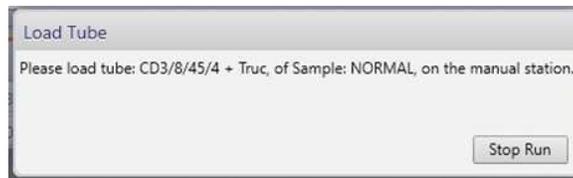


Figura 66: Load Tube

3. Homogenize a primeira amostra e carregue-a no instrumento. A aquisição começará automaticamente.
4. Ao finalizar a aquisição, será aberta a janela **Unload Tube** (Remova o Tubo) solicitando a retirada do tubo da probe. Retire-o e aguarde até a janela **Load Tube** (Carregar o tubo) ser aberta novamente solicitando o encaixe do próximo tubo de amostra.



Figura 67: Upload tube

Ao finalizar a aquisição das amostras, verifique se os resultados dos BD Trucount™ Control Beads e dos pacientes estão corretos (Ver o tópico **FASE PÓS-ANALÍTICA** na página 80 para exemplos de Lab Report de amostras e dos BD Trucount™ Control Beads).

1. Para visualizar os resultados dos BD Trucount™ Control Beads e das amostras dos pacientes, selecione a amostra na Worklist. A amostra selecionada ficará com uma seta **AZUL** à sua esquerda.



Figura 68: Amostra selecionada

2. A janela abaixo da **Worklist Entries** terá o nome da amostra selecionada e exibirá o seu Lab Report.
  - a. Caso o Lab Report esteja conforme o esperado para o exame de CD4/CD8, clique em **Approved** para confirmar o resultado.

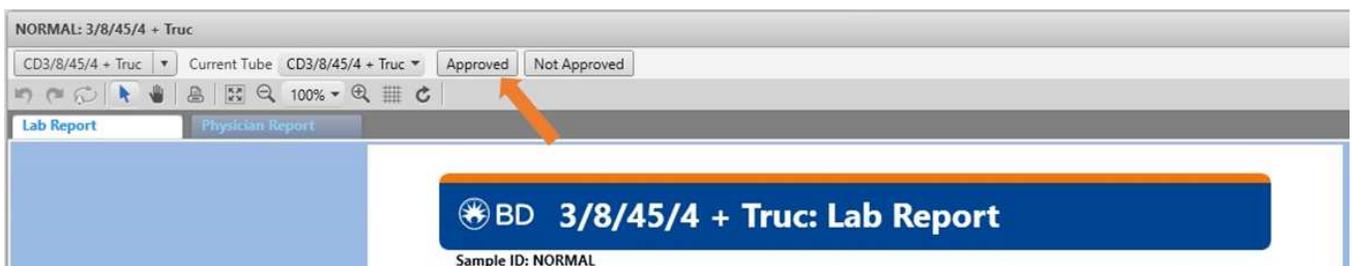


Figura 69: Lab Report Approved

- b. Caso observe alguma falha na análise da amostra, execute os procedimentos corretivos que forem necessários.

Se o posicionamento dos gates estiver incorreto, clique sobre o gate e mová-o para a posição correta no gráfico. Após isso, clique em **Approved**.



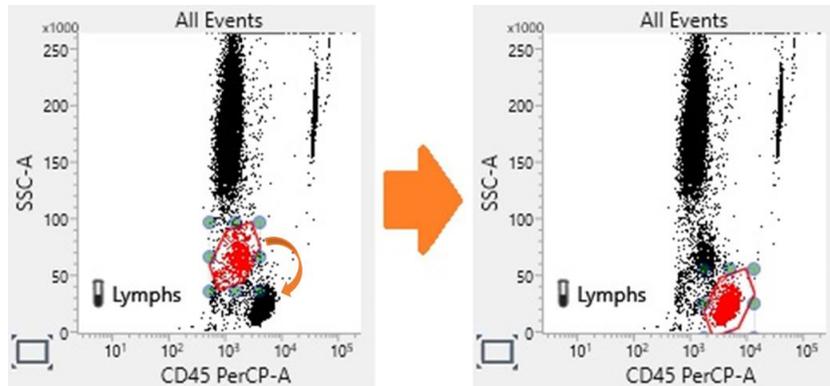


Figura 70: Posicionamento dos gates

Se houver problemas no preparo da amostra, faça uma nova preparação e adquira novamente. Selecione a amostra na Worklist (a amostra selecionada ficará com uma seta **AZUL** à sua esquerda) e selecione a opção **Re-Acquire from Pointer**. Após confirmar que o resultado está correto, clique em **Approved**.

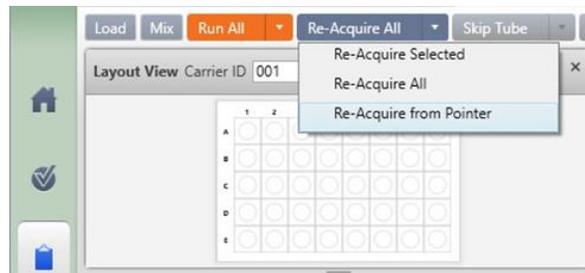


Figura 71: Re-Acquire

**NOTA:** O arquivo de exportação é gerado **SOMENTE** se o botão **Approved** for selecionado, e conterá **SOMENTE** os resultados das amostras aprovadas.

## FASE PÓS-ANALÍTICA

### Interpretação de resultados

#### Amostras

Após a leitura de cada amostra, o BD FACSuite Clinical gera dois laudos: o **Lab Report** e o **Physician Report**. O **Lab Report** é a aba exibida sempre que selecionamos uma amostra na Worklist, e 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, e pode ser visualizado ao clicar na aba *Physician Report* que está à direita da aba *Lab Report*.



Figura 72: Physician Report

Valores mínimos necessários configurados no FACSuite Clinical:

- 300 segundos (5 minutos) ou
- 10 mil eventos totais
- CD45+ Lymphs Events (Linfócitos)  $\geq$  2500 eventos
- Beads Events  $\geq$  1000 eventos

A análise de consistência dos resultados também deve ser realizada:

- Pureza do gate de linfócitos (CD45 x SSC)
- A soma (% ou cels/ $\mu$ L) de CD3+CD4+CD8- mais CD3+CD4-CD8+ mais CD3+CD4+CD8+ mais CD3+CD4-CD8- deve ser igual a CD3+

O FACSuite Clinical gera valores celulares em números de eventos analisados (Value) para **Beads** (Bead Events) e **Linfócitos** (Lymphs Events). Também são gerados valores percentuais (%Lymphs) e de células/ $\mu$ L (Abs Cnt) para os demais dados da tabela do Lab Report, sendo que para esse último é necessária a utilização dos tubos BD TruCOUNT no preparo da rotina.



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 *gate*, o número de eventos existente naquela região é compilado, o valor é dividido pelo número de eventos de linfócitos (Lymph Events) e multiplicado por 100.

$$\% \text{ de células} = \frac{\text{Número de eventos dentro da região de interesse} \times 100}{\text{Número de eventos de linfócitos (CD45+ Lymphs Events)}}$$

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

Já os valores absolutos (células/ $\mu\text{L}$ ) 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:

**BD 3/8/45/4 + Truc: Lab Report**

**Sample ID: NORMAL**  
**Sample Name:**  
**Case Number:**

Acquired Using: Worklist_001	Approved: 6/25/2019 3:08:11 PM	Entry Status: Approved
Trucount Lot ID: 18212	Beads Per Pellet: 49800	
Cytometer: BD FACSLyric	Cytometer SN: R659180000203	Software: BD FACSuite Clinical v1.1.1

Results Summary (Abs Cnt is in cells/ $\mu\text{L}$ )		
Label	%Lymphs	Value or Abs Cnt
Bead Events		1,837
Lymphs Events		2,499
Lymphs		1,355
CD3+	74.67	1,012
CD3+CD4+	46.66	632
CD3+CD4+ (excl. dual pos.)	46.22	626
CD3+CD8+	26.17	355
CD3+CD8+ (excl. dual pos.)	25.73	349
CD3+CD4+CD8+	0.44	6
CD3+CD4-CD8-	2.28	31

<b>Volume de sangue lido:</b> $n^{\circ} \text{ de Beads contadas} \times \frac{\text{Volume de sangue pipetado } (\mu\text{L})}{N^{\circ} \text{ total de Beads no tubo}}$
<b>Contagem absoluta de linfócitos CD45+:</b> $\frac{n^{\circ} \text{ de eventos CD45 + contados}}{\text{volume de sangue lido } (\mu\text{L})}$

<b>Volume de sangue lido:</b> $1837 \times \frac{50\mu\text{L}}{49800} = 1,844\mu\text{L de sangue}$
<b>Contagem absoluta de linfócitos CD45+:</b> $\frac{2499}{1,844\mu\text{L}} = 1355,20 \text{ Cels}/\mu\text{L}$

**Figura 73:** Contagens Absolutas – Lab Report.

Assim, o valor de CD3+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 linfócitos T 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 (*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 1000. Nessa seção foram utilizadas a referência 9 descrita no capítulo final desse documento e a instrução de uso do reagente BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC.

### **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 BD Trucount™ Absolute Count Tubes foram atingidos.

A diferença deste tubo para um tubo de amostra é que neste caso apenas os gráficos SSC-A x APC-A e PE-A x FITC-A são apresentados. No primeiro gráfico as *beads* do BD Trucount™ Absolute Count Tubes e dos BD Trucount™ Control Beads apresentam a cor marrom. No segundo gráfico as *beads* do BD Trucount™ Absolute Count Tubes são exibidas com a cor verde, e as *beads* dos BD Trucount™ Control Beads aparecem como um grupo de eventos roxos. Assim como as *beads* dos tubos TruCOUNT, as *beads* BD Trucount™ Control Beads 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 BD Trucount™ Absolute Count Tubes no gráfico PE-A x FITC-A).

O valor de **BD Trucount™ Control Beads Events** (Eventos das *beads* do controle trucount) indica o número de eventos de *beads* BD Trucount™ Control Beads que passaram pela célula de fluxo. O FACSuite Clinical divide este valor pelo volume de sangue calculado (como anteriormente) e gera, então, a contagem absoluta de *beads* de controle (**Abs Cnt beads/ $\mu$ L**). Na interpretação desses dados, o que deve ser feito é a comparação entre o valor de **Abs Cnt** com os valores fornecidos pelo fabricante (esses valores estão na caixa dos BD Trucount™ Control Beads), levando em consideração seu desvio padrão (representado por SD na caixa do reagente).



# Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

## BD FACSLytic™ – Módulo Básico

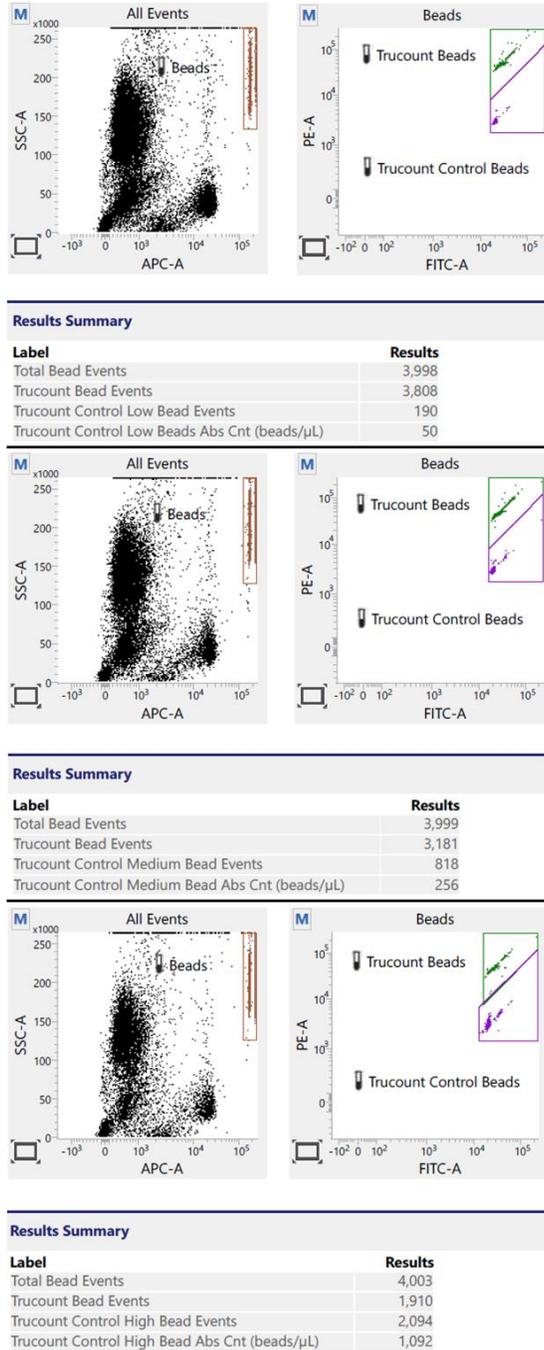


Figura 74: Visualização do Controle baixo (Low), médio (Medium) e alto (High).



Como a contagem absoluta correta de cada controle é conhecida, um resultado fora do intervalo esperado ( $\pm 1SD$ ) indica a reprovação do controle em questão no teste, porém se a rotina deverá ser descartada ou não, dependerá de uma análise mais detalhada de cada controle utilizando as regras de Westgard. A importância em se realizar os controles diariamente quando se tem rotina é que os mesmos ajudam a avaliar a pipetagem do operador e a identificar o tipo de erro que podem estar inseridos na rotina (sistemático, aleatório, etc).

**IMPORTANTE:** O FACSuite Clinical não permite a inserção dos valores esperados e do desvio padrão para cada BD Trucount™ Control Beads. Para avaliar a qualidade dos resultados gerados na aquisição dos BD Trucount™ Control Beads, insira os valores de **BD Trucount™ Control Beads Abs Cnt (beads/ $\mu$ L)** na planilha de Levey-Jennings.

### **Regras de Westgard na rotina CD4/CD8**

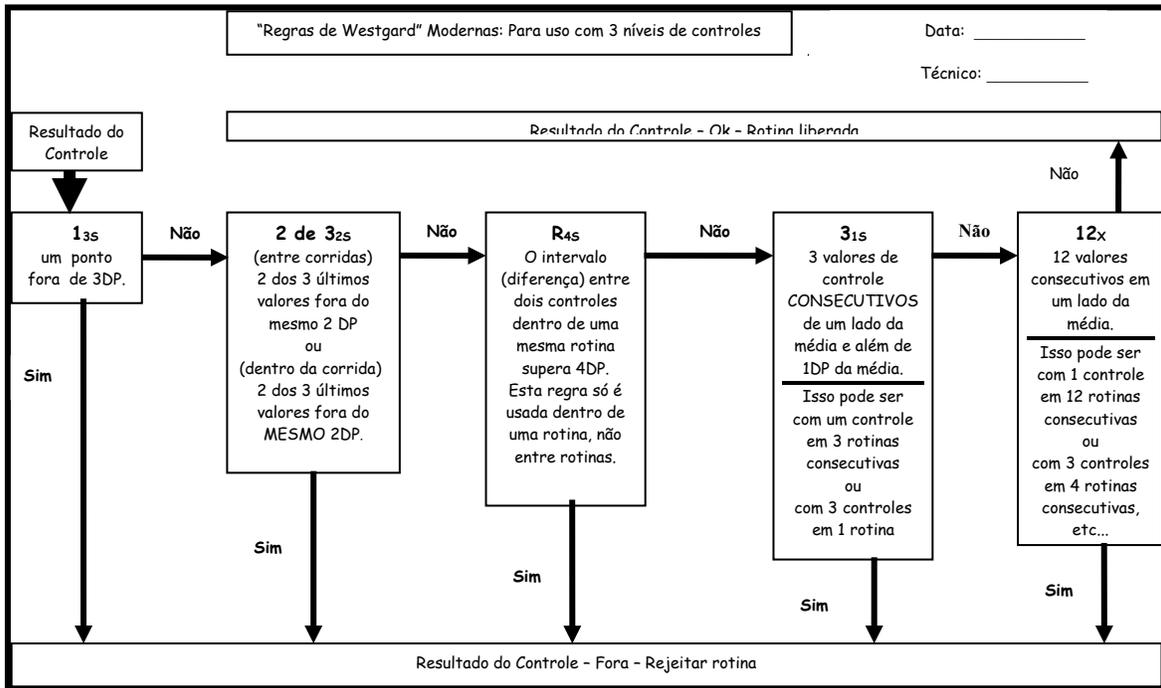
No ano de 2008 o Departamento de DST, Aids e hepatites virais iniciou a implementação do sistema de avaliação e monitoramento da qualidade através de planilhas eletrônicas específicas para a construção de gráficos de Levey-Jennings e aplicação das regras de Westgard para interpretações e tomadas de ações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

- ✓ Preencher o Mapa de trabalho de CQ com os dados obtidos dos valores das beads dos controles baixo, médio e alto obtidos;
- ✓ No arquivo em formato "Excel" - [CQ FACSCalibur - Controle de qualidade](#) - 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™ Control Beads.
- ✓ As telas do lado direito de cada gráfico referentes ao BD Trucount™ Control Beads, deverão ser preenchidas com o número de lote e com os valores de média e desvio padrão informados na caixa do reagente.
- ✓ A medida que, os valores de média e desvio padrão são preenchidos para cada nível de controle, 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 avaliação da rotina de trabalho.

**Fluxograma das Regras de Westgard**



Nessa seção foi utilizada a referência 10, descrita no capítulo final desse documento.



## 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 BD FACSLytic™? 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?

---

---

---

---

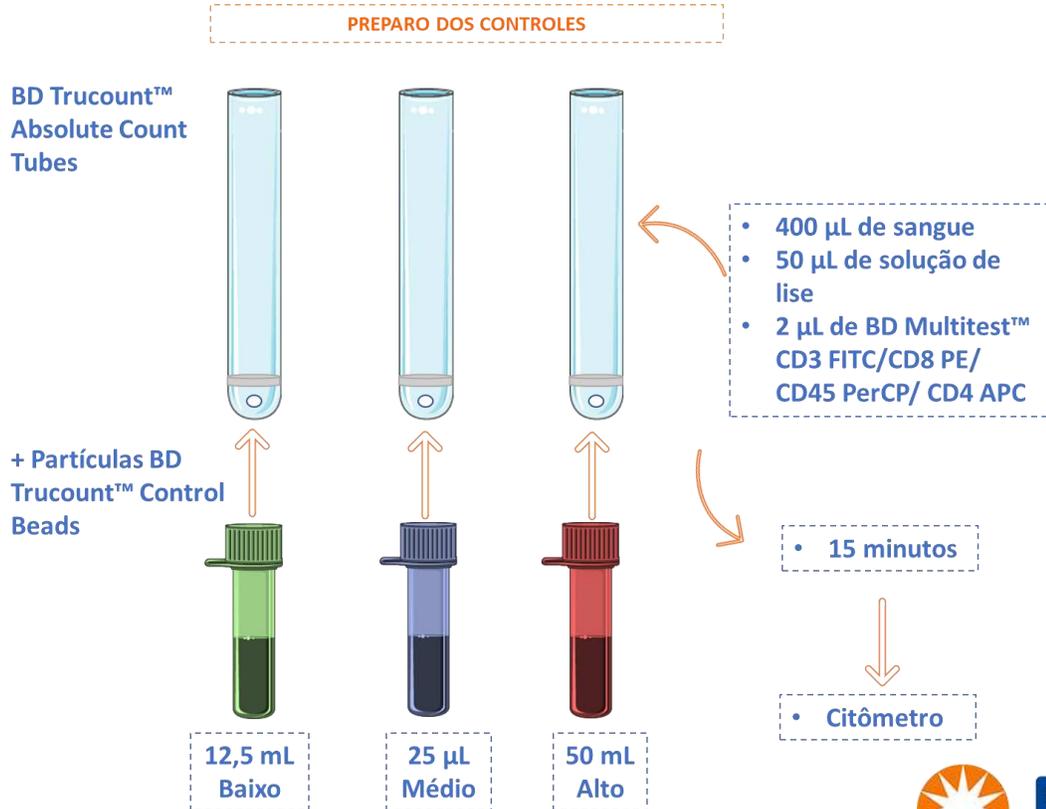
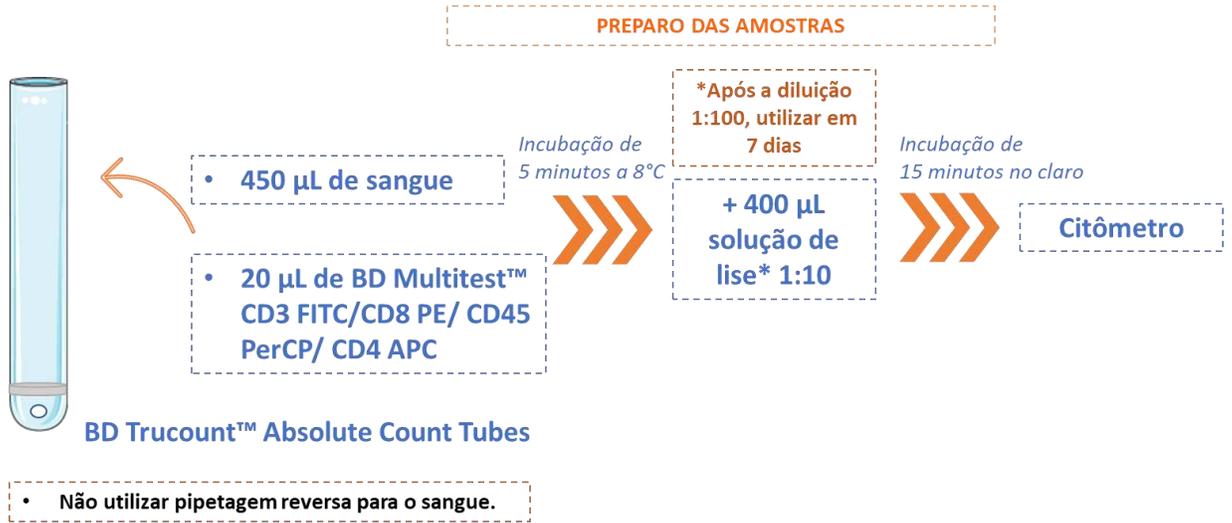
5. Devemos agitar bem os tubos dos BD Trucount™ Control Beads antes de pipetá-los ou isto é desnecessário? Explique.

---

---



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



## 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:**

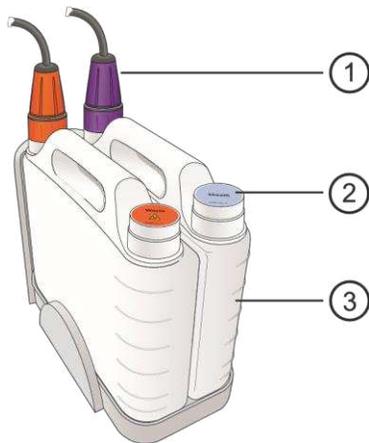
1. A partir da barra de menu, clique em Cytometer > Daily Clean. (Citômetro > Limpeza Diária). O diálogo Daily Clean (Limpeza Diária) é aberto.
2. Coloque um tubo contendo 2 mL de solução de hipoclorito a 0,5 a 1% na porta de tubo manual, e então clique em Continue (Continuar).
3. Quando solicitado, coloque um tubo contendo aproximadamente 3 mL de água DI na porta de tubo manual, e então clique em Continue (Continuar). O diálogo fechará quando o processo estiver concluído.
4. Carregue um tubo contendo 2 mL de água DI na porta de tubo manual.
  - a. Sempre deixe um tubo de água DI na porta de tubo manual quando o sistema não estiver em uso.
5. Limpe as superfícies externas.
  - a. Limpe as superfícies externas do citômetro e área de trabalho.
  - b. Descarte os materiais de limpeza usados em recipientes para resíduos infectantes.
6. Na barra de menu, selecione Cytometer > Shutdown. (Citômetro > Desligamento). O diálogo Cytometer Shutdown (Desligamento do Citômetro) é aberto.
7. Clique em Yes (Sim). O botão Power pisca em verde por alguns segundos, o sistema é desligado e o botão Power se torna âmbar.
8. Encerre a sessão do software.
  - a. No lado direito da barra de menu, clique no botão Log Out (Encerrar Sessão).
  - b. No diálogo de confirmação, clique em Yes (Sim).



**Preenchimento do tanque de BD FACSTFlow™:**

Este tópico descreve como verificar o nível de BD FACSTFlow™, ilustra os componentes do tanque de BD FACSTFlow™ e descreve como preencher o tanque de BD FACSTFlow™. Os tanques de BD FACSTFlow™ e de resíduos devem ser colocados nivelados ou abaixo o citômetro. A colocação dos tanques mais alta que o citômetro pode causar sifonamento não controlado.

O tanque de fluido de BD FACSTFlow™ é translúcido, de forma que é possível verificar visualmente o nível de fluido. Em adição, o status de fluidos no citometro piscará em **ÂMBAR** como alerta o usuário quando o tanque está próximo de ficar vazio e inicia um timer de 10 minutos. É necessário preencher o tanque antes de decorrer os 10 minutos, a fim de evitar interrupção da aquisição. O sistema para a operação quando o timer expira. Se o tanque não for preenchido dentro de 10 minutos, o status do citometro ficará **VERMELHO** e o sistema impede operação adicional.



Nº	Descrição
1	Conector
2	Tampa de preenchimento
3	Tanque de fluido de BD FACSTFlow™ no suporte

Figura 75: Tanques

Para preencher o tanque de BD FACSTFlow™:

1. Desconecte o conector do tanque de BD FACSTFlow™, girando-o em sentido anti-horário.



Figura 76: Encaixe

2. Remova o tanque de BD FACSTow™ do suporte e coloque-o em uma estação de preenchimento.
3. Remova a tampa e encha o tanque com solução BD FACSTow™.
4. Reinstale a tampa e coloque o tanque no suporte.
5. Reinstale o conector e vire em sentido horário para apertar.

#### **Esvaziamento do tanque de resíduos:**

Este tópico descreve como verificar o nível do tanque de resíduos, ilustra os componentes do tanque de resíduos e descreve como esvaziar o tanque de resíduos. Os tanques de BD FACSTow™ e de resíduos devem ser colocados nivelados ou abaixo do citômetro. A colocação dos tanques mais alta que o citômetro pode causar sifonamento não controlado.

O tanque de resíduos padrão é translúcido, de forma que é possível verificar visualmente o nível de fluido. Em adição, o status de fluidos no citometro piscará em **ÂMBAR** c como alerta o usuário quando o tanque está próximo de ficar vazio e inicia um timer de 10 minutos. Se o tanque não for esvaziado dentro de 10 minutos, o status do citometro ficará **VERMELHO** e o sistema impede operação adicional.

Nº	Descrição
1	Conector
2	Tampa de preenchimento
3	Tanque de resíduos padrão no suporte

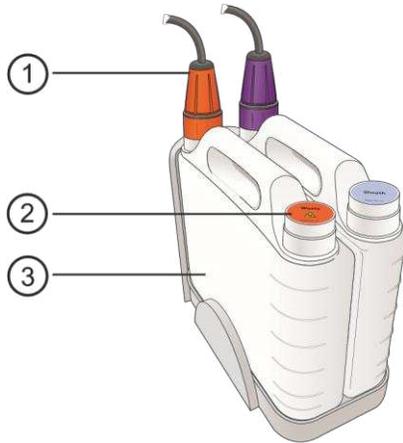


Figura 77: Esvaziando tanque de resíduos



**Atenção:** Todas as amostras e materiais biológicos podem transmitir infecção potencialmente fatal. Para prevenir exposição a agentes com perigo biológico, exponha o conteúdo do recipiente de resíduos a uma solução de hipoclorito (0,5 a 1% do volume total) antes do descarte. Descarte o resíduo de acordo com regulamentações locais. Use precauções apropriadas e use roupas de proteção, proteção ocular e luvas adequadas.

Para esvaziar o tanque de resíduos:

1. Verifique se o sistema não está processando nenhuma amostra.
2. Desconecte o conector do tanque de BD FACSTow™ girando-o em sentido anti-horário.



Figura 78: Encaixe tanque de resíduos

3. Remova o tanque do suporte e coloque-o em uma estação de descarte.



4. Remova a tampa de preenchimento e esvazie o tanque. Segure o tanque em um ângulo à medida que este é esvaziado, e despeje lentamente para evitar respingar o conteúdo.
5. Adicione a solução de hipoclorito concentrado ao tanque, para que este seja 10% do volume total tanque.
6. Reinstale a tampa de preenchimento e instale o tanque no suporte.
7. Reinstale o conector vire em sentido horário para apertar.

## MANUTENÇÕES PERIÓDICAS

Além do procedimento acima as manutenções abaixo devem ser realizadas de forma periódica:

Procedimento	Descrição	Frequência
Execução da limpeza diária	Descontamina o SIT com hipoclorito 0,5 a 1% e água DI.	Diária
Purge Sheath Filter	Remove bolhas de ar do filtro de fluido de corrente.	Semanal (mínimo)
Execução da limpeza mensal	Descontamina o percurso do fluido de corrente do citômetro com hipoclorito 0,5 a 1%.  <b>IMPORTANTE</b> Efetue o bypass the sheath filter (desvio do filtro de fluido de corrente) antes de executar o procedimento de Limpeza Mensal.	Mensal
Troca do Sheath Filter	Previne a entrada no citometro de partículas e bolhas de ar provenientes do tanque de BD FACSTow™.  <b>NOTA</b> Atualize os detalhes do filtro de fluido de corrente selecionando Cytometer > Maintenance> Replace Sheath Filter.	A cada 3 meses / Semestral



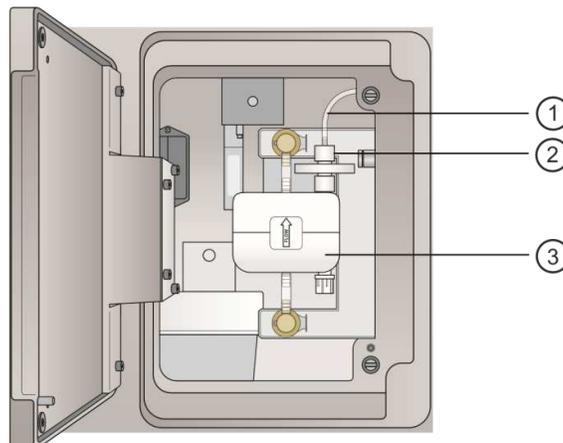
### **Execução da limpeza mensal (Monthly Clean):**

O procedimento de limpeza mensal enxágua o sistema fluídico com uma solução de hipoclorito 0.5 a 1%, seguido por um outro enxágue com água DI e BD FACSFlow™. O procedimento leva cerca de 20 minutos para ser concluído. Este procedimento deve ser realizado pelo menos uma vez por mês. Pode ser realizado mais frequentemente, se o sistema estiver muito sujo ou se houver suspeita de qualquer contaminação.

Para realizar o procedimento de limpeza mensal:

1. Verifique se o sistema está no modo Standby (não realizando aquisição nem realizando nenhuma outra tarefa relacionada a componentes fluídicos)
2. A partir a barra de menu, selecione Cytometer > Monthly Clean (Citômetro > Limpeza Mensal). A caixa de diálogo Monthly Clean (Limpeza Mensal) é aberta.
3. Carregue um tubo com 2 mL de solução de hipoclorito a 0,5 a 1% na porta de tubo manual.
4. Encha um tanque com 2 L de solução de hipoclorito a 0,5 a 1%.
  - a. Recomendamos o uso de um tanque extra dedicado para a solução de hipoclorito a 0,5 a 1% neste procedimento. Se você tiver este tanque, remova o conector do tanque de BD FACSFlow™ e instale-o no tanque de hipoclorito dedicado.
  - b. Se você não tiver um tanque de solução de hipoclorito dedicado, esvazie tanque de BD FACSFlow™ e encha com a solução de hipoclorito a 0,5 a 1%.
5. Esvazie o tanque de resíduos.

Remova o Sheath Filter (filtro de BD FACSFlow™) e armazene-o cuidadosamente para colocá-lo de volta no lugar no final deste procedimento.



**Figura 79:** Descrição de componentes

6.

Nº	Descrição
1	Linha de respiro
2	Porca do conector da linha de respiro
3	Sheath Filter (filtro de BD FACSTlow™)

- a. Abra a porta no lado esquerdo do chassi.
  - b. Desconecte a linha de respiro na parte superior do filtro desrosqueando a porca do conector. Pode gotejar algum fluido da conexão.
  - c. Pressione as abas de desconexão rápida na parte superior e inferior do filtro, e remova o filtro do chassi.
7. Instale a linha de desvio pressionando as duas abas de desconexão rápida na posição até ouvir um clique e no conector da linha de respiro.



**Atenção!** A instalação da montagem de desvio é uma etapa crítica. Falha em fazer isso pode danificar o sistema.

8. A montagem de desvio é mostrada instalada na figura a seguir.

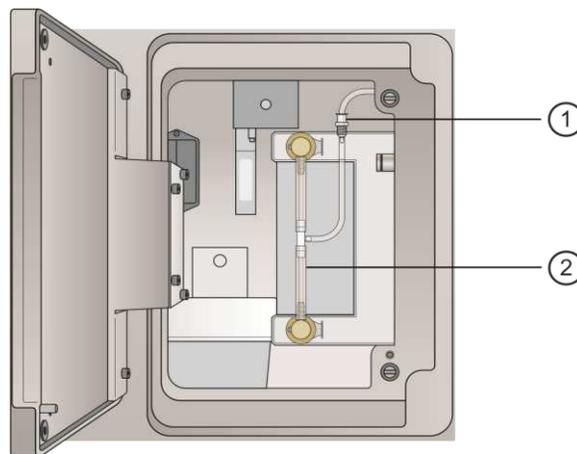


Figura 80: Montagem do desvio

Nº	Descrição
1	Porca do conector da linha de respiro
2	Linha de desvio

9. Clique em Continue (Continuar) no diálogo para iniciar o processo de limpeza. Uma barra de progresso no diálogo mostra o status do processo.
10. Quando o ciclo de solução de hipoclorito estiver concluído, remova o tubo que continua a solução de hipoclorito e troque por um tubo contendo 3 mL de água DI.
11. Remova o tanque de solução de hipoclorito e conecte o tanque de BD FACSTFlow™.
  - a. Se você estiver usando um tanque de solução de hipoclorito dedicado, desconecte-o e instale o conector no tanque de BD FACSTFlow™.
  - b. Se você não estiver usando um tanque de hipoclorito dedicado, esvazie qualquer solução de hipoclorito remanescente do tanque de BD FACSTFlow™, enxágue completamente com água DI e preencha novamente com BD FACSTFlow™.
12. Clique em Continue (Continuar) para continuar o processo de limpeza. Uma mensagem é apresentada quando o processo está concluído, e o software registra o horário e data em que o procedimento foi realizado.
13. Remova linha de desvio e reinstale o Sheath Filter (filtro de BD FACSTFlow™).
14. Selecione Cytometer > Fluidics > Purge Sheath Filter (Citômetro > Fluídica > Purgar Filtro de BD FACSTFlow™) e realize este comando duas vezes para remover quaisquer bolhas de ar que possam ter se formado durante o processo. Você pode também bater o filtro delicadamente para ajudar a remover as bolhas de ar.

**Troca do Sheath Filter (filtro de BD FACSTFlow™):**

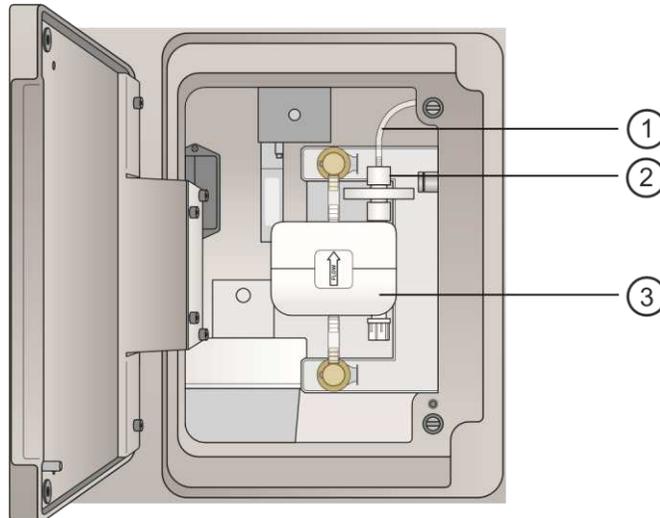
Este tópico descreve como substituir o Sheath Filter na lateral do citômetro e também descreve como substituir o Supply-line filter holder.

Para substituir Sheath Filter (filtro de BD FACSTFlow™):

1. Verifique se o sistema está no modo Standby (não realizando aquisição nem realizando nenhuma outra tarefa relacionada a componentes fluídicos)



2. Abra a porta no lado esquerdo do chassi. Pode ser necessário ter que remover o suporte do tanque de fluido se este não estiver posicionado próximo ao citômetro.



**Figura 81:** Trocando o filtro

3. Desconecte a linha de respiro na parte superior do filtro, desrosqueando a porca do conector.

Nº	Descrição
1	Linha de respiro
2	Porca do conector da linha de respiro
3	Sheath Filter (filtro de BD FACSTFlow™)

4. Pressione as abas de desconexão rápida na parte superior e inferior do filtro e remova o filtro do chassi.
5. Descarte o filtro usado.
6. Instale um novo filtro, com a seta de fluxo apontando para cima, inserindo cada extremidade nos conectores.
7. Reconecte a linha de respiro na parte superior do filtro rosqueando na porca do conector.
8. Selecione Cytometer > Fluidics > Purge Sheath Filter (Citômetro > Fluídicos > Purgar Filtro de BD FACSTFlow™) para trazer BD FACSTFlow™ para o novo filtro. Este processo dura cerca de um minuto para

ser concluído. Repita este procedimento duas vezes. Você deve ver fluido na linha de respiro quando estiver concluído.

9. Feche a porta e retome a operação normal.
10. Selecione Cytometer > Maintenance > Replace Sheath Filter. (Citômetro > Manutenção > Substituir Filtro de BD FACSTFlow™)
11. Insira as informações sobre o novo filtro e então clique em OK.

Para substituir o Supply-line filter holder:

1. Desconecte o conector do tanque de BD FACSTFlow™ girando-o em sentido anti-horário.
2. Remova o conector da base do tanque de BD FACSTFlow™ desrosqueando-o e puxando para fora.
3. Gire para abrir o suporte do filtro da linha de suprimento e puxe separando, para acessar o filtro. Veja a figura a seguir.

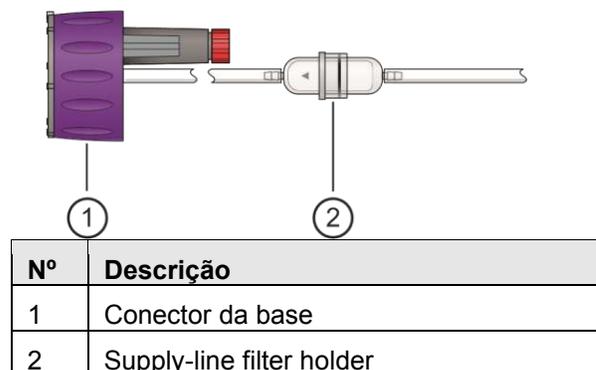


Figura 82: Substituir Supply-line filetr holder

4. Remova o filtro usado e instale um novo filtro.
5. Empurre as duas metades do suporte do filtro de volta juntas, e gire para fechar.
6. Coloque a Supply-line de volta no tanque de BD FACSTFlow™ e rosqueie sobre o conector da base até que esteja presa.

## MANUTENÇÕES EXTRAS

Os procedimentos abaixo podem ser realizados de acordo com a necessidade e em procedimentos de solução de problemas:

Procedimento	Função	Como realizar
SIT Flush	Efetua retrolavagem do SIT com BD FACSCFlow™ e remove bolhas da célula de fluxo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Retire o tubo da probe.</li> <li>• Clique em Cytometer &gt; Fluidics &gt; SIT Flush</li> </ul>
Clean Cuvette	Circula a solução de limpeza através da célula de fluxo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insira um tubo contendo 3ml hipoclorito 0,5 a 1% ou FACSClean.</li> <li>• Clique em Cytometer &gt; Fluidics &gt; Clean Cuvette (realize o procedimento 3 vezes)</li> <li>• Retire o tubo contendo contendo hipoclorito 0,5 a 1% ou FACSClean.</li> <li>• Insira um tubo contendo 3ml de água destilada</li> <li>• Clique em Cytometer &gt; Fluidics &gt; Clean Cuvette (realize o procedimento 3 vezes).</li> </ul>
Drain and Fill Flow Cell	Remove bolhas persistentes da célula de fluxo.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insira um tubo com 2ml de água destilada.</li> <li>• Clique em Cytometer &gt; Fluidics &gt; Drain and Fill Flow Cell</li> </ul>
Purge Sheath Filter (filtro de BD FACSCFlow™)	Remove ar do Sheath Filter (filtro de BD FACSCFlow™).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insira um tubo com 2ml de água destilada.</li> <li>• Clique em Cytometer &gt; Fluidics &gt; Purge Sheath Filter</li> </ul>



## EXERCÍCIOS 6

1. Qual a função dos procedimentos abaixo?

**SIT Flush:** \_\_\_\_\_

**Clean Cuvette:** \_\_\_\_\_

**Clean Fluidics:** \_\_\_\_\_

**Drain and Fill Flow Cell:** \_\_\_\_\_

**Purge Sheath Filter:** \_\_\_\_\_

2. Porque devemos realizaro Bypass do Sheath Filter (filtro de BD FACSTFlow™) durante a limpeza mensal (Monthly Clean)?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3. Verifique se os passos para realização da manutenção diária e desligamento estão corretos e modifique caso necessário:

### Manutenção após aquisição e desligamento:

1. A partir da barra de menu, clique em Cytometer > Monthly Clean. O diálogo Monthly Clean (Limpeza Diária) é aberto.
2. Coloque um tubo contendo 0,2 mL de solução de hipoclorito a 10% na porta de tubo manual, e então clique em Continue (Continuar).
3. Quando solicitado, coloque um tubo contendo aproximadamente 3 mL de água DI na porta de tubo manual, e então clique em Continue (Continuar). O diálogo fechará quando o processo estiver concluído.
4. Carregue um tubo contendo 2 mL de BD FACSTFlow™ na porta de tubo manual.
  - a. Sempre deixe um tubo de água DI na porta de tubo manual quando o sistema não estiver em uso.
5. Limpe as superfícies externas.
  - a. Limpe as superfícies externas do citômetro e área de trabalho.
  - b. Descarte os materiais de limpeza usados em recipientes para resíduos infectantes.



6. Na barra de menu, selecione Cytometer > Shutdown. (Citômetro > Desligamento). O diálogo Cytometer Shutdown (Desligamento do Citômetro) é aberto.
7. Clique em Yes (Sim).
8. Aperte o botão Power para desligar o equipamento.
9. Encerre a sessão do software.
  - a. No lado direito da barra de menu, clique no botão Log Out (Encerrar Sessão).
  - b. No diálogo de confirmação, clique em Yes (Sim).

## **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 no equipamento.

### **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, os resultados devem ser analisados com bastante cautela pois a bilirrubina e os quilomícrons prejudicam a dispersão de luz e podem gerar 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.

### 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 Beads: geladeira (2°C a 8°C).
- ✓ BD™ FC Beads 7-Color Kit: geladeira (2°C a 8°C).
- ✓ BD Trucount™ Absolute Count Tubes: geladeira (2°C a 8°C) ou temperatura ambiente (20 a 25°C).
- ✓ BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC: geladeira (2°C a 8°C).
- ✓ BD Trucount™ Control Beads: geladeira (2°C a 8°C).
- ✓ Solução de lise: geladeira (2°C a 8°C) ou temperatura ambiente (20 a 25°C).
- ✓ BD FACSTy™: temperatura ambiente (20 a 25°C).
- ✓ BD FACSClean Solution e/ou hipoclorito: temperatura ambiente (20 a 25°C).
- ✓ Água destilada: temperatura ambiente (20 a 25°C).



## Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

BD FACSLytic™ – Módulo Básico

Reagente	Temperatura ambiente (20°C a 25°C)	Geladeira (2°C a 8°C)	Freezer (-20°C)
BD™ CS&T Beads		X	
BD™ FC Beads 7-Color Kit		X	
BD Trucount™ Absolute Count Tubes	X	X	
BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC		X	
BD Trucount™ Control Beads		X	
BD FACS Lysing Solution	X	X	
BD FACSTFlow™	X		
BD FACSClean Solution e/ou hipoclorito	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.

### Preparo das Soluções:

Prepare as soluções sempre com água destilada. Respeite as concentrações estipuladas nas instruções de uso e nunca utilize reagentes vencidos. A solução de lise deve ser diluída em água destilada na proporção 1:10 e, após a diluição, deve ser utilizada por, no máximo, 7 dias.



## 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. A luz de *Status de aquecimento* ficou âmbar durante a inicialização do BD FACSLyric™

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Retirada do(s) reservatório(s) de fluidos e/ou remoção do tubo da probe durante o aquecimento dos <i>lasers</i>	Certifique-se que o(s) reservatório(s) estejam conectados e tenha um tubo preso na probe durante toda a inicialização do BD FACSLyric™

### Solução de problemas de software:

#### 1. 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.

### Solução de problemas de aquisição:

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



Causas possíveis	Soluções recomendadas
Sistema de fluidos sujo ou entupido	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Realize o <i>SIT Flush</i>.</li> <li>2. Realize o <i>Daily Clean</i>.</li> <li>3. Realize a <i>Monthly Clean</i>.</li> </ol>
Bolhas de ar na célula de fluxo ou no <i>Sheath Filter</i> (Filtro de BD FACSTlow™)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Realize o <i>Purge Sheath Filter</i>.</li> <li>2. Realize o <i>Drain and Fill Flow Cell</i>.</li> </ol>

**2. A taxa de eventos cai durante a aquisição**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Células sedimentadas na parte inferior do tubo	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Clique em <i>Stop &gt; Stop Tube</i> para encerrar a aquisição e misture o tubo manualmente.</li> <li>2. Clique em <i>Re-Acquire &gt; Re-Acquire From Pointer</i>.</li> </ol>
Sistema de fluidos sujo ou entupido	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Realize o <i>SIT Flush</i>.</li> <li>2. Realize o <i>Daily Clean</i>.</li> <li>3. Realize a <i>Monthly Clean</i>.</li> </ol>

**3. Quantidade excessiva de debris**

Causas possíveis	Soluções recomendadas
Amostras marcadas há muito tempo	Verifique a estabilidade da amostra.
Mal preparação da amostra	Verifique o procedimento de marcação.



**4. Populações distorcidas ou com padrões inesperados**

<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções recomendadas</b>
Célula de fluxo suja, entupida ou contém bolhas de ar	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Realize o <i>SIT Flush</i>.</li> <li>2. Realize o <i>Daily Clean</i>.</li> <li>3. Realize a <i>Monthly Clean</i>.</li> </ol>
Bolhas de ar na célula de fluxo ou no <i>Sheath Filter</i> (Filtro de BD FACSTFlow™)	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Realize o <i>Purge Sheath Filter</i>.</li> <li>2. Realize o <i>Drain and Fill Flow Cell</i>.</li> </ol>
Amostra lida estava incorreta	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Clique em <i>Stop &gt; Stop Tube</i> para encerrar a aquisição caso o BD FACSLyric™ esteja adquirindo a amostra.</li> <li>2. Insira a amostra correta e clique em <i>Re-Acquire &gt; Re-Acquire From Pointer</i>.</li> </ol>

**Solução de problemas ao adquirir as beads CS&T:**

**1. Nenhuma esfera detectada**

<b>Causas possíveis</b>	<b>Soluções recomendadas</b>
Não há esferas no tubo	Certifique-se de que o tubo de amostra correto esteja sendo processado.
Esferas não misturadas corretamente	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Submeta o frasco de esferas ao vórtex antes de preparar a suspensão de esferas.</li> <li>2. Submeta a suspensão de esferas ao vórtex antes de executar as esferas.</li> </ol>



## 2. Resultado de reprovação do CQ

Causas possíveis	Soluções recomendadas
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.
rCVs elevados causados por bolhas/detritos.	3. Realize o <i>Purge Sheath Filter</i> . 4. Realize o <i>Daily Clean</i> . 5. Realize a <i>Monthly Clean</i> .

### 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 FACSLyric™ Clinical, ela não está livre problemas que só são identificados no momento da aquisição dos dados pelo operador. Por isso, antes de começar a leitura das amostras, é importante assegurar de que os lotes do anticorpo monoclonal BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC™, dos tubos TruCOUNT e do BD Trucount™ Control Beads foram inseridos na **Library** corretamente. Além disso, o número de *beads* por *pellet* do BD Trucount™ Absolute Count Tubes e a média e desvio padrão das *beads* do BD Trucount™ Control Beads também devem ser inseridos na **Library**, e a **Worklist** deve estar correta 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 pessoas vivendo com HIV, é uma das situações citadas a cima. Sendo a citometria de fluxo uma metodologia que trabalha com a identificação de células baseada na detecção de fluorescência e dispersão de luz, a presença de compostos lipídicos podem afetar os resultados da técnica.



Isso porque esses compostos têm influência nos parâmetros que nos fornecem resultados baseados na dispersão de luz, como por exemplo, os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). Amostras com lipêmia intensa induzem uma perda na resolução dos parâmetros e conseqüentemente o que observamos é a compressão das células no eixo de SSC (granulosidade) dificultando a separação das populações celulares em linfócitos, monócitos e granulócitos. Nessa seção foram utilizadas as referências 9 e 11, descritas no capítulo final desse documento.

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

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

### **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 conseqüências da destruição das hemácias pelas auto-aglutininas é a anemia hemolítica auto-imune, que pode em sua grande maioria, ser causada por anticorpos quentes (IgG/C3) ou em uma frequência menor, por anticorpos frios (ou crioanticorpos), mais comumente encontrada em pacientes idosos (idade superior a 60 anos) ou ainda, de maneira aguda e transitória, em adultos jovens, após quadro infeccioso viral. Essas aglutininas podem ser:

- Euglobulinas: Todas as imunoglobulinas – IgM, IgG, IgA, IgD e IgE
- Macroglobulinas: Globulinas do plasma de peso molecular aumentado, a mais conhecida são:

$\alpha$ -2macroglobulinas e  $\alpha$ -2macroglobulinas (IgM) – Ligação formando IgM de cadeia pesada.

Algumas condições patológicas promovem o aumento dessas imunoglobulinas, que se ligam entre si formando imunocomplexos, que dificultam a ligação Ag-Ac, conforme referências 12 e 13, no final desse documento.

Macroglobulinemia de Waldenström, Crioglobulinemias, etc.



### Macroglobulinemia de Waldernstrom

- Grande proliferação de células B;
- Alta produção de IgM;
- Atinge 4:1.000.000 pessoas;
- Maior característica é a hiperviscosidade sanguínea;
- Prevalência em homens;
- Pacientes com hepatite C.

### Gamopatias Monoclonais

- Mieloma Múltiplo;
- Leucemia Plasmocitária;
- Gamopatia transitória.

### Hipergamaglobulinemia

- Infecções hepáticas;
- AIDS;
- Doenças autoimunes.

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

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 início a um procedimento de lavagem da amostra, assim como o realizado para amostra com lipemia intensa:

#### **Protocolo de centrifugação e substituição do volume plasmático**

1. Homogeneizar suavemente a amostra colhida em tubo de EDTA 10 vezes por inversão;
2. Separar uma alíquota de 2 mL de sangue do tubo primário. É importante conservar material (tubo primário) sem ter sido manuseado.
3. Centrifugar a amostra alíquotada 400g de 3 a 5 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25° C);



4. Após centrifugação retirar o plasma cuidadosamente para que a camada leucocitária seja mantida intacta (nesse momento é importante medir exatamente qual foi a quantidade de plasma retirado);
5. Substituir o volume de plasma retirado pelo mesmo volume de solução fisiológica;
6. Em seguida homogeneizar suavemente e processar a amostra normalmente segundo o protocolo de marcação da técnica recomendada pela BD;
7. Realizar a aquisição da amostra no citômetro de fluxo BD FACSLytic™.

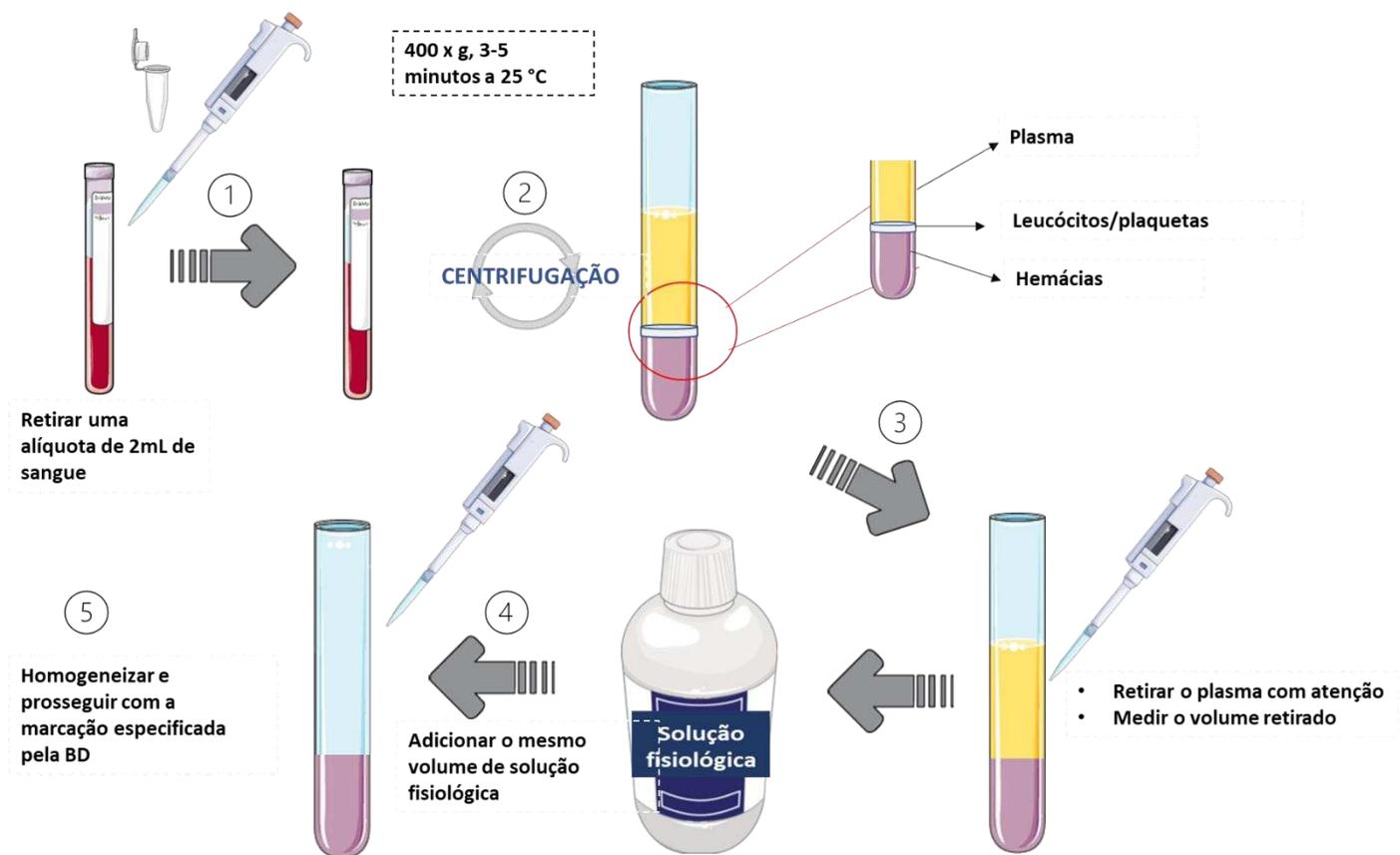


Figura 83: Procedimento de lavagem de amostras

Quando o procedimento acima é adotado, nossa ressalva é que no laudo médico se acrescente o comentário dizendo que a amostra passou por um procedimento de lavagem. Esse comunicado é muito importante



uma vez que esse procedimento pode afetar as contagens absolutas. Por isso uma validação do método seria ideal e é individual de cada laboratório.

### 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.

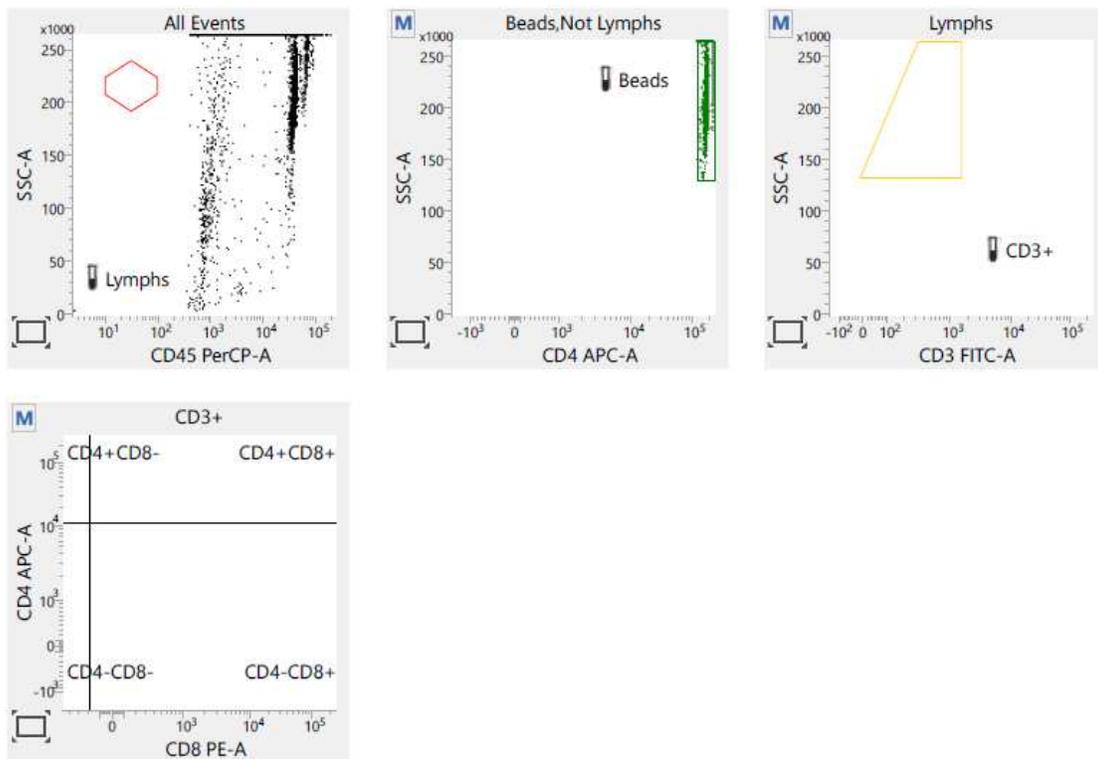


Figura 84: Gráfico ausência de monoclonal

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

### Lise dos eritrócitos

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



## Treinamento para Quantificação de Linfócitos T CD4+/CD8+

BD FACSLytic™ – Módulo Básico

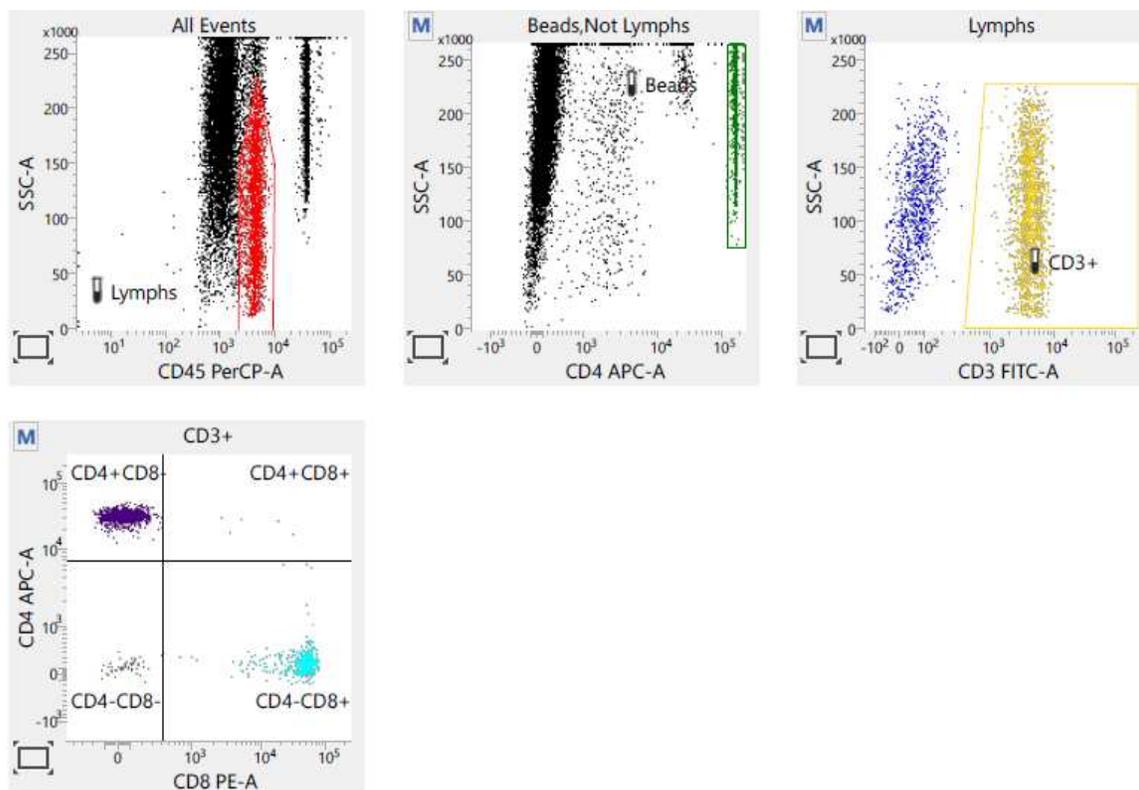


Figura 85: Gráfico lise incompleta

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

## EXERCÍCIOS 7

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

- a. CS&T \_\_\_\_\_
- b. FC Bead \_\_\_\_\_
- c. BD Multitest™ CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP/CD4 APC \_\_\_\_\_
- d. BD Trucount™ Absolute Count Tubes \_\_\_\_\_
- e. BD Trucount™ Control Beads \_\_\_\_\_
- f. BD FACS™ Lysing Solution \_\_\_\_\_
- g. BD FACSTy™ \_\_\_\_\_

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

a. amostra lipêmica:

---

b. amostra com fibrina:

---

c. amostra icterica:

---

d. amostra hemolisada:

---

e. amostra com coágulos:

---

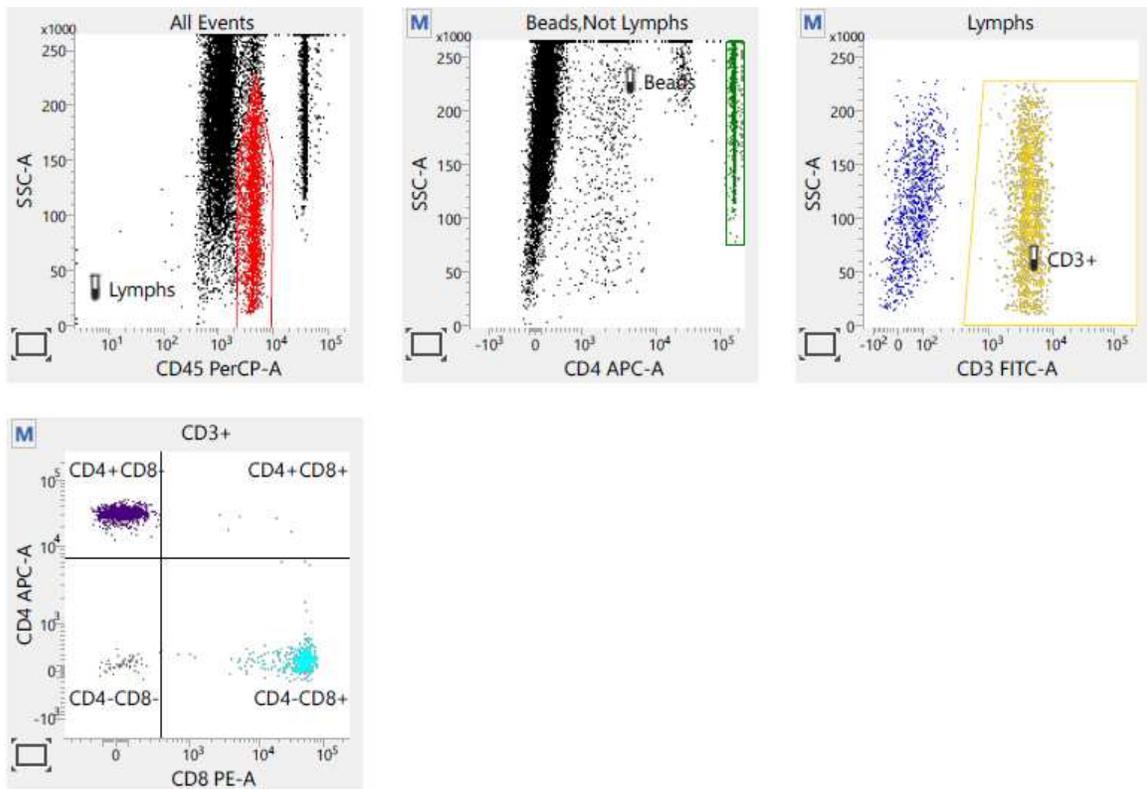
3. Descreva o protocolo de lavagem da amostra que pode ser realizado quando não conseguimos analisar uma amostra devido à substâncias presentes no plasma

---

---



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.



## **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 ou Hipoclorito 0,5%.
- A desinfecção do reservatório de esgoto do equipamento deve ser realizada com a adição de hipoclorito puro (500ml). Antes de esvaziar o reservatório, deixe-o em repouso por pelo menos 30 minutos após o término da rotina.
- É proibido fumar, comer, beber, manipular lentes de contato e pipetar qualquer material com a boca nas dependências da área técnica do laboratório.
- O reencepe 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**

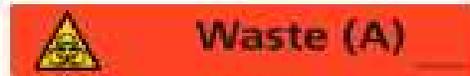
- O descarte de todo e qualquer material contaminado deve ser realizado em recipientes adequados e devidamente identificados com o símbolo de Risco Biológico.
- Tais recipientes devem se localizar a uma altura que permita a visualização da abertura.



## Rotulagem Preventiva

Símbolo	Significado
	<b>CUIDADO</b> 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 <i>Laser</i>
	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.

## GERENCIAMENTO DE ARQUIVOS

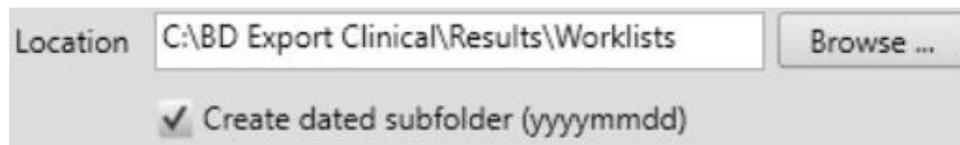
O sistema BD FACSLytic™ gera os arquivos a seguir.

<i>Arquivo</i>	<i>Descrição</i>
<i>FCS</i>	Arquivos FCS 3.1 são salvos por padrão, mas podem ser exportados a qualquer momento após a aquisição.
<i>Worklist</i>	Os arquivos de Worklist contêm todas as informações inseridas na aba da Worklist, incluindo informações de amostras, informações do BD Trucount™ Absolute Count Tubes, BD Trucount™ Control Beads e informações de laboratório, bem como os dados do teste.
<i>Lab reports</i>	Um Lab Report é salvo automaticamente para cada amostra dentro da Worklist e pode ser exportado manualmente após a aquisição.
<i>CSV de resultados</i>	Os arquivos CSV são salvos <b>SOMENTE</b> quando você clica em <b>APPROVED</b> após a análise das amostras. Um único arquivo CSV é salvo com todas as amostras aprovadas na Worklist, e esse arquivo deve ser exportado ao <b>SISCEL</b> .
<i>Relatórios de PQC ou CQC</i>	Um relatório de PCQ ou CQC é salvo para cada teste de PCQ ou CQC executados no instrumento.

## EXPORTAÇÃO DE RESULTADOS PARA O SISCEL

Para se realizar a exportação dos dados:

1. Busque os arquivos de exportação no diretório:



Location

Create dated subfolder (yyyymmdd)

2. Com um pendrive posicionado no computador, copie o arquivo da pasta e cole no pendrive. Leve o pendrive para o computador onde o programa SISCEL está instalado e faça o interfaceamento seguindo o procedimento operacional padrão para exportação de dados que você tem no laboratório (enviado pelo Ministério da Saúde).



# MATERIAL ADICIONAL



## GUIA DE PIPETAGEM REVERSA

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

### 1. Objetivo

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

### 2. Escopo

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

### 3. Referências

3.1. *Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. Cytometry, 42:327-346, referência 14..*

### 4. Equipamento

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

### 5. Materiais

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



## 7. Procedimento

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

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

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

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

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

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

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

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

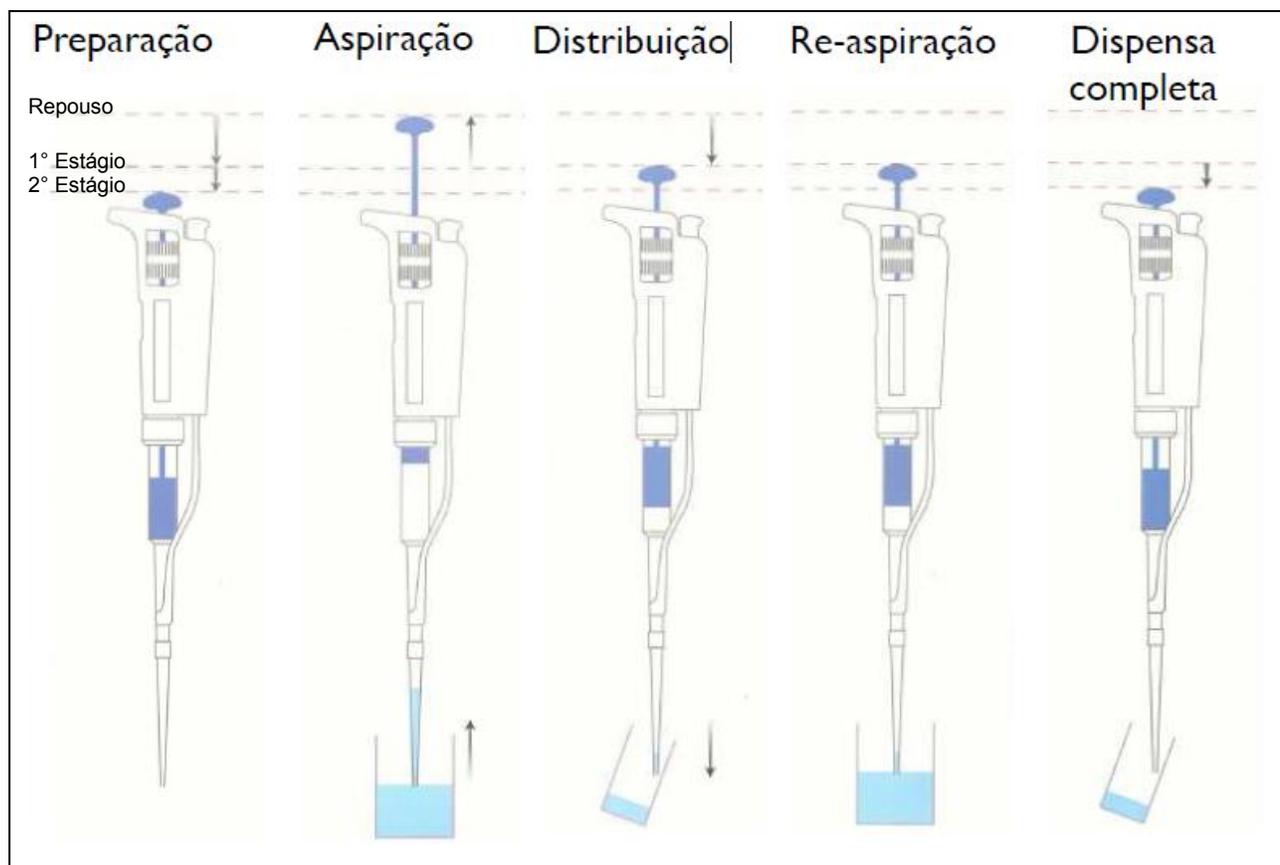
7.1.7. Dispense o sangue em um tubo vazio empurrando gentilmente o botão de aspiração/dispensa até o primeiro estágio. Segure o botão nessa posição por alguns segundos. O sangue que restou na ponteira não deve ser dispensado.

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

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



Veja o resumo do procedimento na figura abaixo:

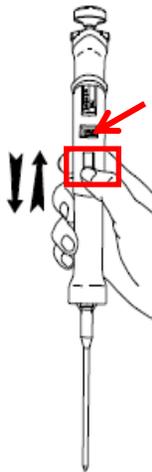


### Utilização da pipeta de repetição

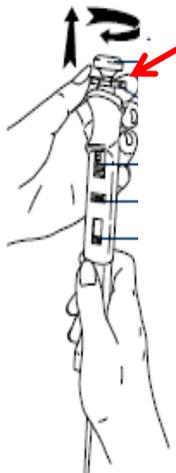
A pipeta de repetição é classificada como pipeta de deslocamento positivo onde a pipeta não tem contato direto com a amostra a ser pipetada, pois o contato é via o pistão que existe na pipeta. Para essa pipeta serão utilizadas seringas de capacidade para 12,5 mL com volume de dispensação de 100 $\mu$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

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

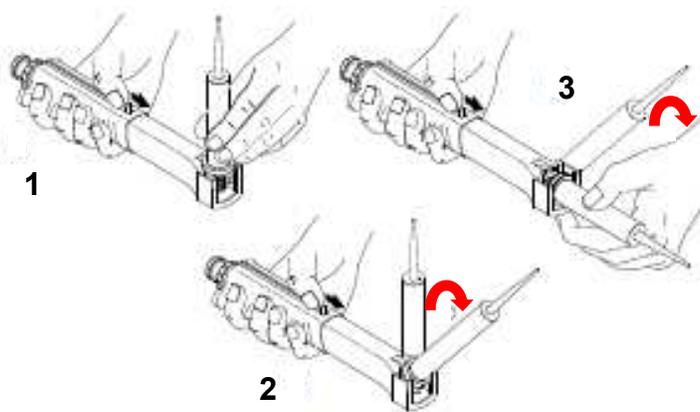
1. Selecionar a seringa a ser utilizada - **12,5 mL**.



2. Seleccionar o volume: destrave a peça preta empurrando para cima e gire até atingir o volume desejado - 450 $\mu$ L.



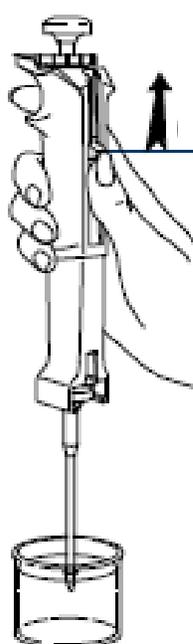
3. Encaixe a seringa na ponta como mostrado na figura abaixo:



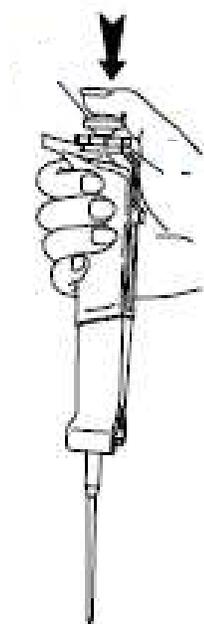
4. Para aspirar prossiga como ilustrado abaixo.



Essa pipeta não possui segundo estágio de dispensa.



Aspirar



Dispensar (até o fim, não possui segundo estágio)

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



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

## **DICAS DE PIPETAGEM**

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

### **1. 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 significativa diminuição do volume desejado. Umedecendo a ponteira você reduzirá a evaporação e não haverá problemas com relação a resistência apresentada pelo material da ponteira e o líquido aspirado.

### **2. Trabalhe em temperatura ambiente**

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

### **3. Examine as ponteiras antes de dispensar a amostra**

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

### **4. Padronize a pipetagem**

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

### **5. Faça uma pausa depois da aspiração**

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



## **6. Retire a pipeta verticalmente**

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

## **7. Evite ficar segurando a pipeta**

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

## **8. Mergulhe a ponteira na profundidade certa**

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

## **9. Use a ponteira correta**

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

## **10. Use velocidades e pressão constantes**

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

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

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



**Erros mais comuns**

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



## **GUIA DE LIMPEZA DA PIPETMAN**

### **Material fornecido pela ANALÍTICA ([www.analiticaweb.com.br](http://www.analiticaweb.com.br))**

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



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

#### **A. DESMONTAGEM (Vide figura 1)**

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

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



**Cuidado para não perder o selo e o'ring.**



Figura 1: Pipeta desmontada.



## **B. LIMPEZA**

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



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

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



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

**Nunca aqueça o handle.**

## **OBSERVAÇÕES:**

- Use solução de detergente com concentração 4% para limpeza de pipetas que 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 ponteiros.

Nessa seção foi utilizada a referência 15, referenciada no final desse documento.



## REFERÊNCIAS

1. Murphy, Kenneth. *Imunobiologia de Janeway*. 8. ed. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.
2. Abbas, A. K et al. *Imunologia Celular e Molecular*. Elsevier, 8ª ed. 2015.
3. Nicholson JKA, Hubbard M, Jones BM. Use of CD45 fluorescence and side-scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blood lysis procedure and flow cytometry. *Communications in Clinical Cytometry*. 1996; 26: 16-21.
4. 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 DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Profilaxia Pós-Exposição (PEP) de Risco à Infecção pelo HIV, IST e Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/tags/publicacoes/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas/>> Acesso em : novembro de 2021.
8. Costa, RN. *Introdução à Citometria de Fluxo: Um manual básico para iniciantes*. 1. ed. Curitiba: Independently published, 2020.
9. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS; CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. *Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep*. 2003 Jan 31;52(RR-2):1-13.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/cq-facscalibur-controle-de-qualidade>> Acesso em: novembro de 2021.
11. Nikolac, Nora. "Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management." *Biochemia medica* vol. 24,1 57-67. 15 Feb. 2014, doi:10.11613/BM.2014.008.
12. 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.
13. Kevin L. Bowen, Erroneous Leukocyte Counts and Cold Agglutinins, *Laboratory Medicine*, Volume 28, Issue 4, 1 April 1997, Pages 247–250, <https://doi.org/10.1093/labmed/28.4.247>



14. Brando B, Barnett D, Janossy G, Mandy F, Aufran B, Rothe G, Scarpati B, D'Avanzo G, D'Hautcourt JL, Lenkei R, Schmitz G, Kunkl A, Chianese R, Papa S, Gratama JW. Cytofluorometric methods for assessing absolute numbers of cell subsets in blood. European Working Group on Clinical Cell Analysis. Cytometry. 2000 Dec 15;42(6):327-46.
15. Analítica. Técnicas de pipetagem e outros materiais de apoio:  
<[https://www.analiticaweb.com.br/literaturas\\_download.php?tit=pipetas&an=d2c6f32fa176e001d4f0c17418efd586&Bgrupo=17&Brepr=10&Bcat=00+T%E9cnicas+de+pipetagem+e+outros+materiais+de+apoio](https://www.analiticaweb.com.br/literaturas_download.php?tit=pipetas&an=d2c6f32fa176e001d4f0c17418efd586&Bgrupo=17&Brepr=10&Bcat=00+T%E9cnicas+de+pipetagem+e+outros+materiais+de+apoio).  
Acesso em : novembro de 2021.

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

***Código para rastreio no sistema Veeva Vault - BD-69666***

