

**TMO - 15 anos**



**Hemonúcleo Regional**  
**JAÚ**



## **PROGRAMAÇÃO**

**Fase Pré analítica**

**Compensação espectral**

**Alex e Dra. Mioko: 15 minutos**

**Classificação dos Padrões de Fluorescência**

**Citometro de Fluxo - Instrumentação**

**Desempenho dos detectores, Linearidade**

**Ana Paula e Nydia : 15 minutos**

**CQ Interno, Plano de contingência**

**Annelise : 15 minutos**

**Marta – Registro e Monitorização Contínua ,**

**Aquisição, Análise, Estratégia De Gate, Fase Pós Analítica : 10 minutos**

**Igor – Reagentes e Rotinas operacionais do Setor : 10 minutos**

**CQ Externo**

**Nydia : 10 minutos**

# Asseguramento da Qualidade

- Soma de todos os procedimentos e funções de Laboratório que levam a um resultado final correto.
- Rastreabilidade do processo
- Boas práticas de Laboratório –
  - Padronização e roteiros (guideliness)

# CITOMETRO DE FLUXO

HIDRÁULICO

ÓPTICO

Fontes de Luz (LASER)

Condensadores

Espelhos/Filtros

Fotomultiplicadores

INFORMÁTICA

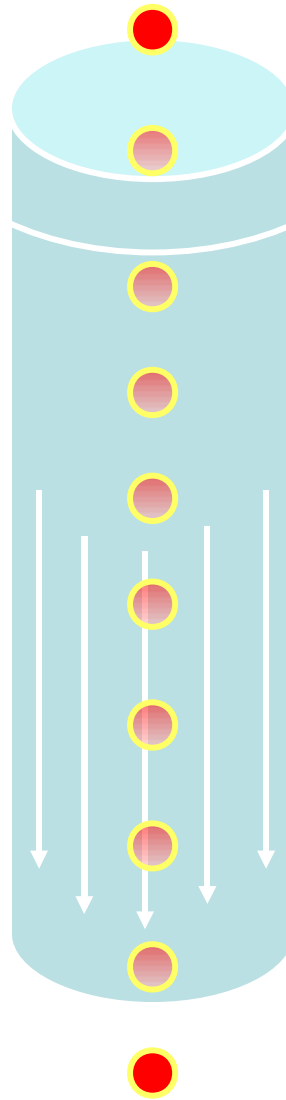


# HIDRÁULICO

FLUXO  
CENTRAL  
(core)

FLUXO  
LAMINAR  
(sheath)

FLUÍDO DO EQUIPAMENTO



CÂMERA DE FLUXO

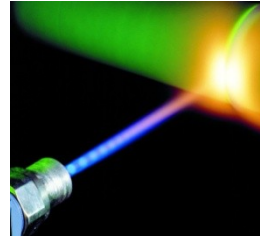
FOCO HIDRODINÂMICO



# ÓPTICO

## FONTES DE LUZ-CITOMETRIA DE FLUXO

RAIOS LASER(\*)



ARGÔNIO (azul) 488 nm

HElio - NEônio (vermelho) 633 nm (gás)

HELIO-CADMIO (violeta) 441 nm



LAMPADAS DE ARCO

MERCURIO



OUTRAS

(\*)Light Amplification by Stimulating Emission of Radiation

Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação

# Exemplos de alguns tipos de laser

## Laser a gás

	Cor	$\lambda$ (nm)
Argônio	azul	488
Idem	verde	514
Criptônio	amarelo	568
Idem	azul	476
Idem	verde	528
Idem	vermelho	647
Dióxido de carbono IV		10600
Fluoreto de hidrogênio IV		2700
Hélio cádmio	violeta	441
Idem	UV	325
Hélio neônio	amarelo	594
Idem	laranja	612
Idem	verde	543
Idem	vermelho	633
Idem	IV	1152
Idem	IV	3390
Nitrogênio UV		337
Xenônio	branco	vários

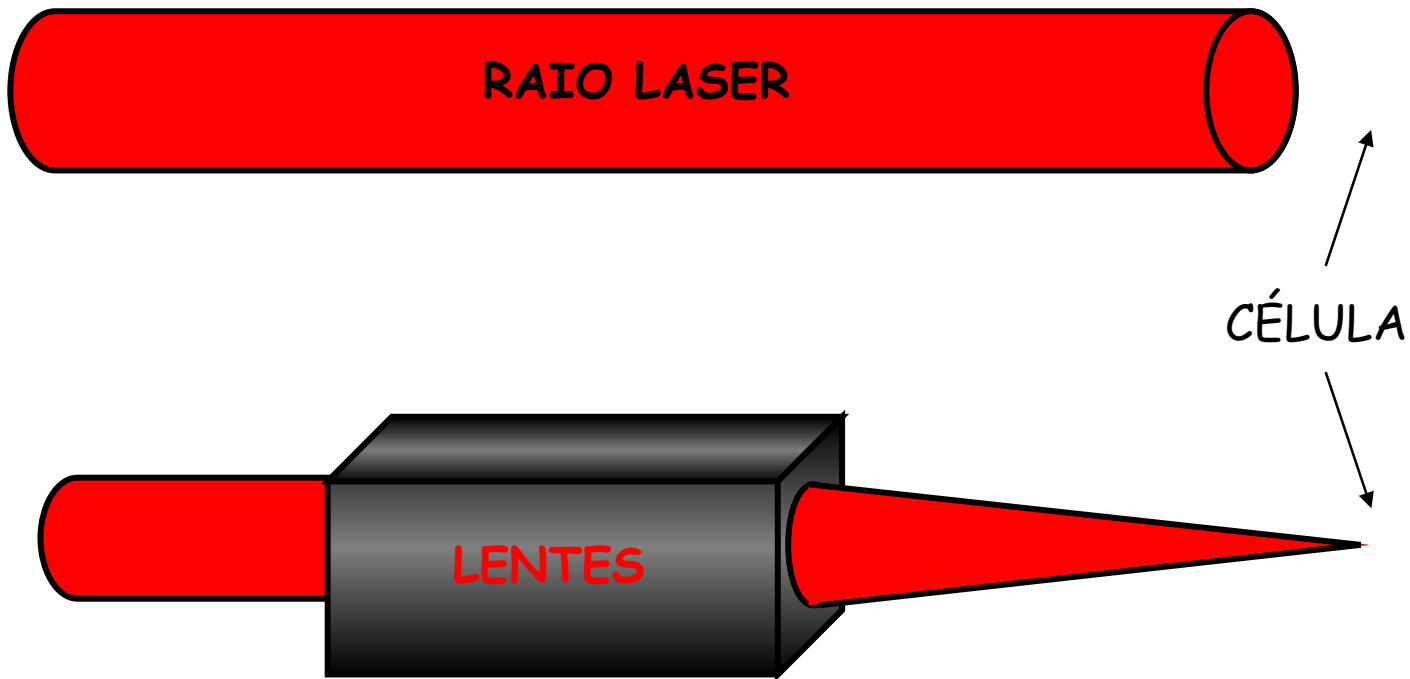
## Laser a gás "Excimer"

Cor	$\lambda$ (nm)
Cloreto de criptônio UV	222
Cloreto de xenônio UV	308
Fluoreto de argônio UV	193
Fluoreto de criptônio UV	248
Fluoreto de xenônio UV	351

## Laser a líquido

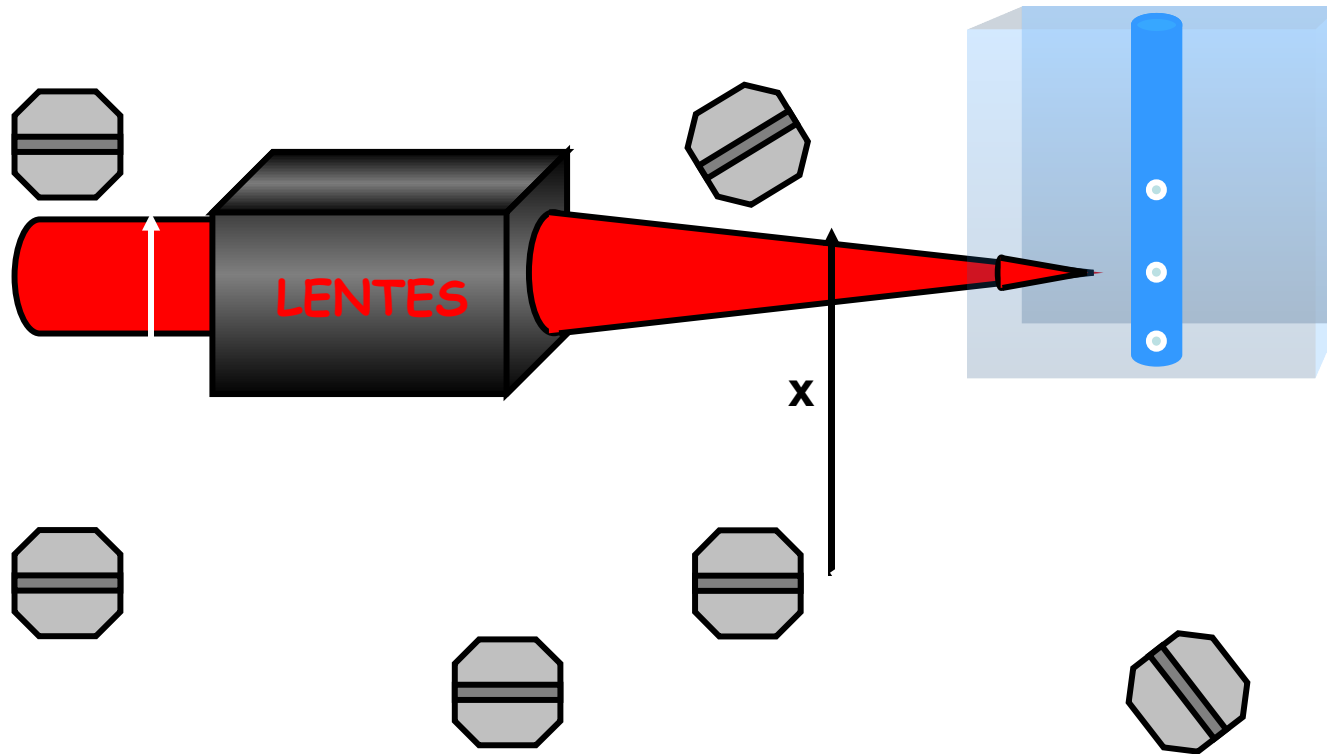
Cor	$\lambda$ (nm)
Coumarin C30	verde 504
Rhodamine 6G IV	570 a 650

# ENFOQUE HIDRODINÂMICO- alinhamento óptico "Beam shaping"

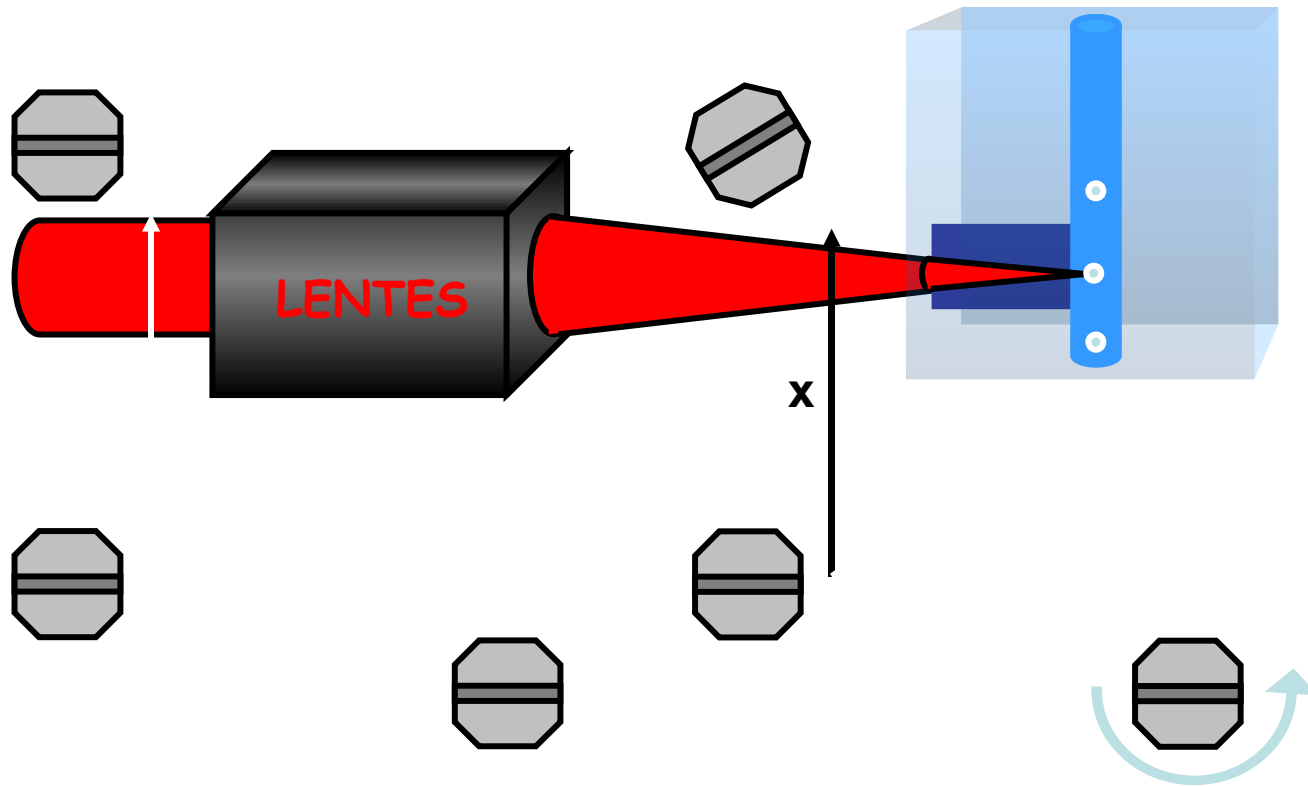




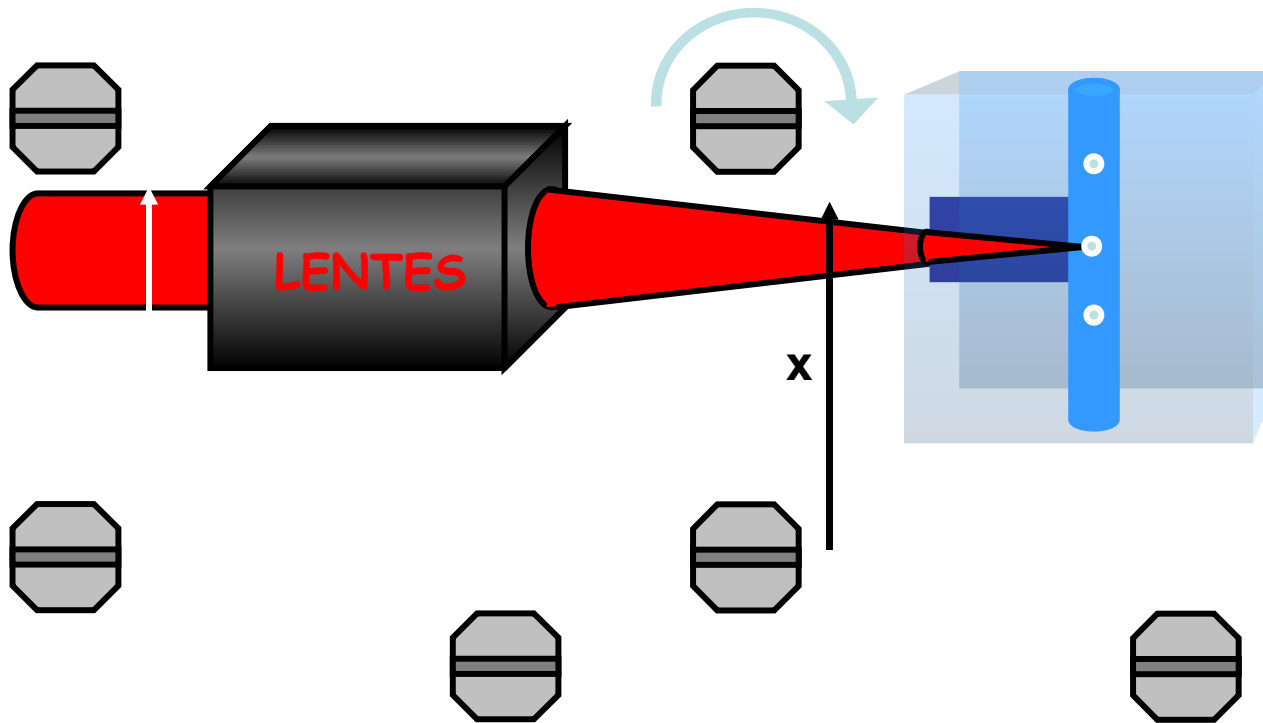
# ALINHAMENTO ÓPTICO



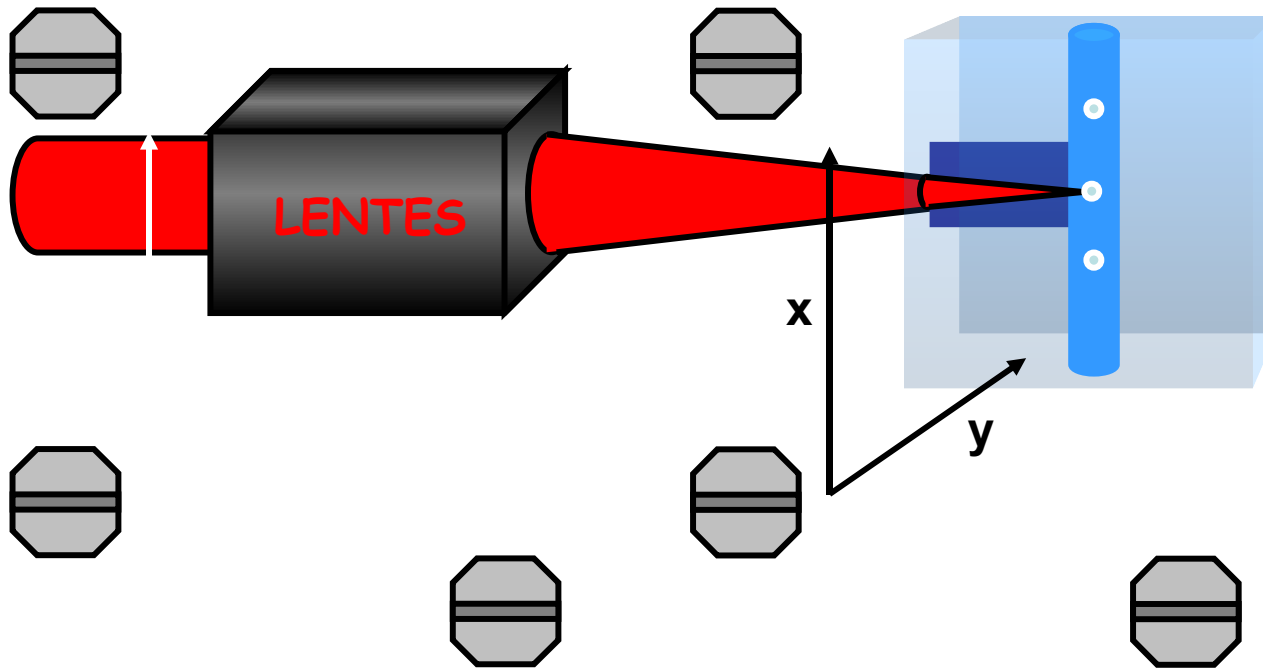
# ALINHAMENTO ÓPTICO



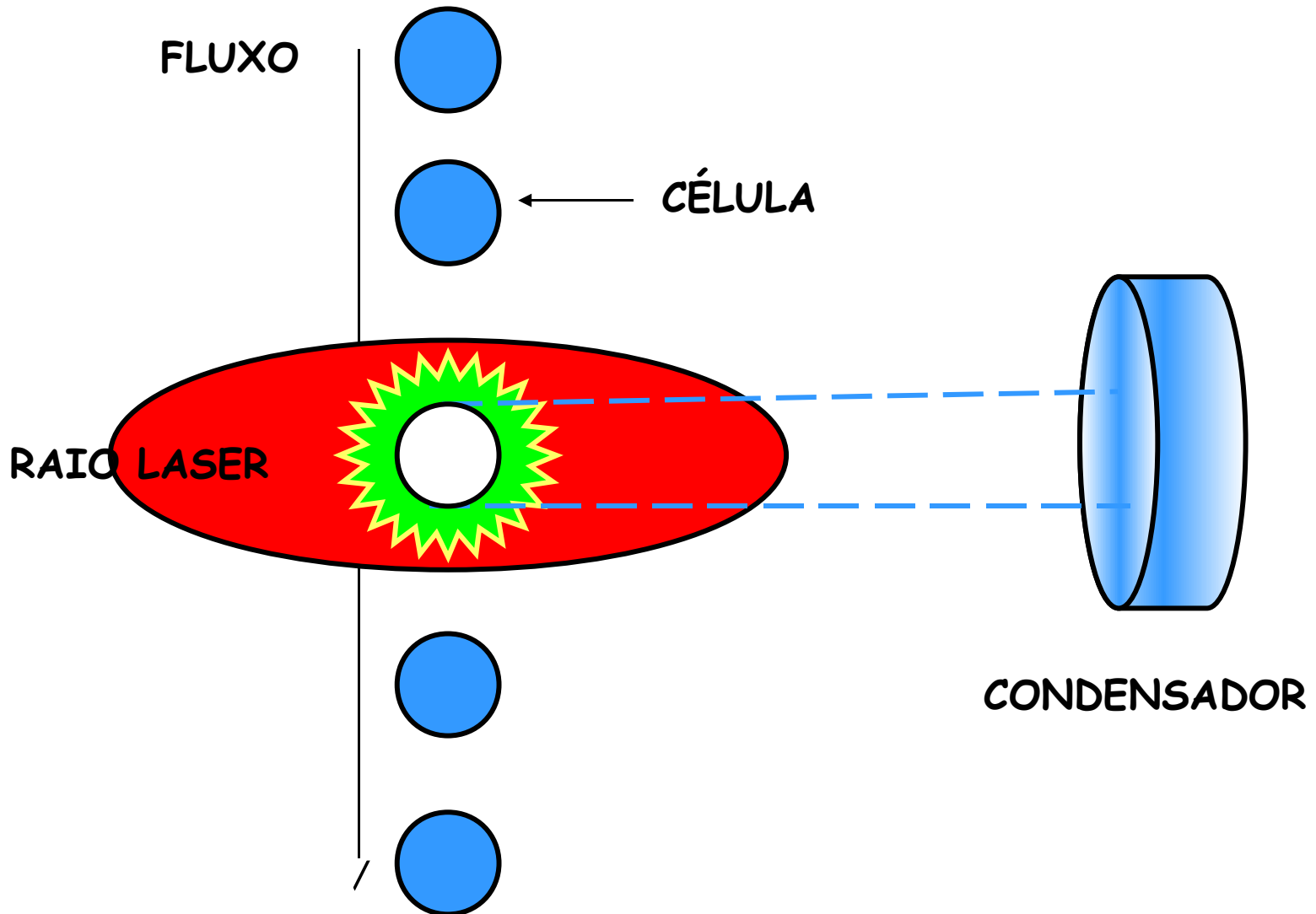
# ALINHAMENTO ÓPTICO



# ALINHAMENTO ÓPTICO



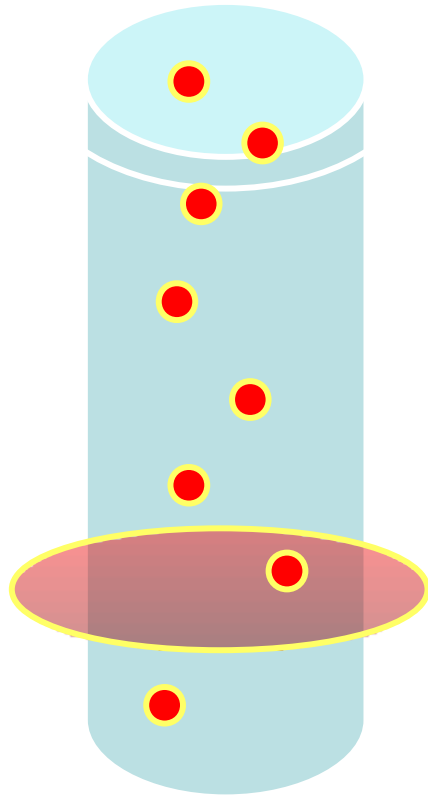
# ENFOQUE HIDRODINÂMICO "Beam shaping"



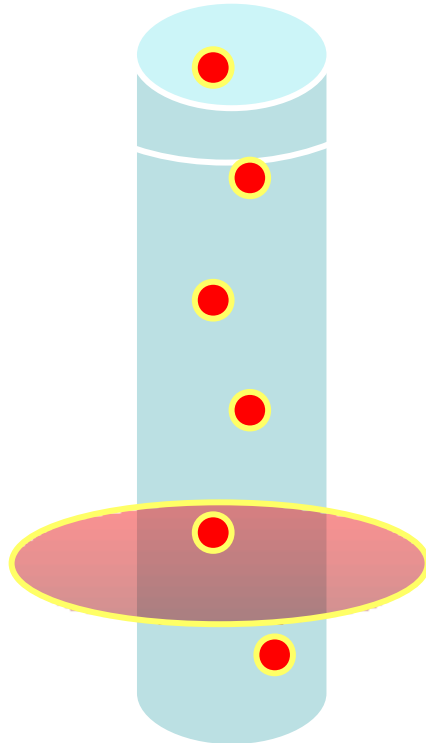
# VELOCIDADE DO FLUXO

---

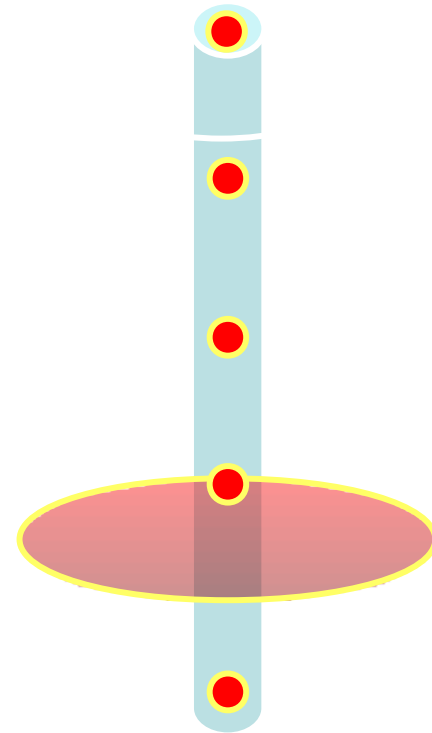
ALTA

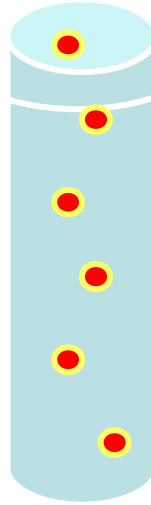
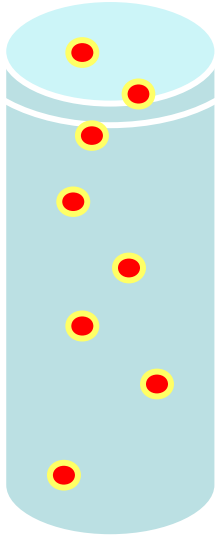


MÉDIA

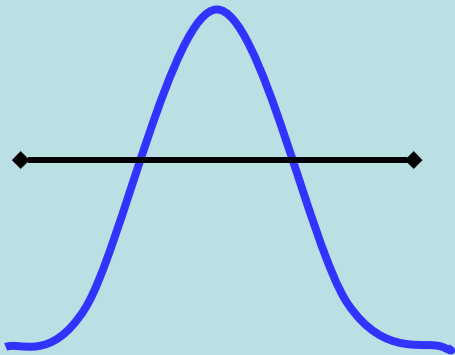


BAIXA

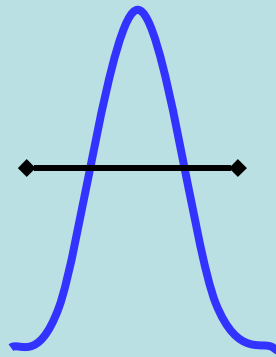




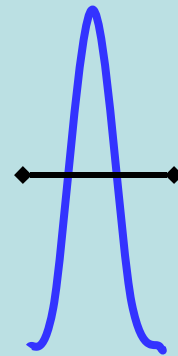
**CV=10%**



**CV=5%**

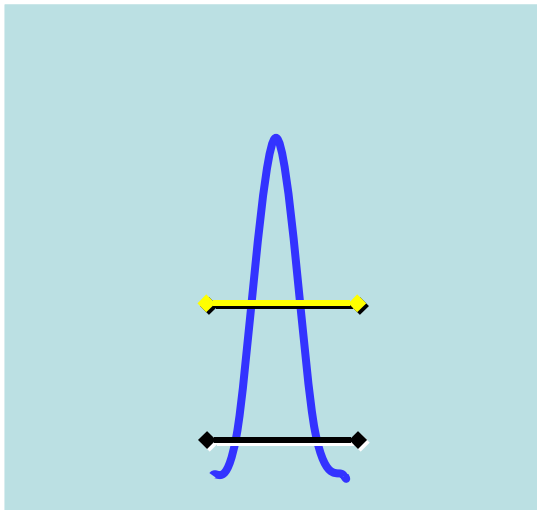


**CV=1%**



# ALINHAMENTO ÓPTICO

- VELOCIDADE DE FLUXO LENTA
- RECONTAGEM  $\geq 1500$  EVENTOS
- COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (HPCV)  $\leq 2\%$   
em todos os parâmetros

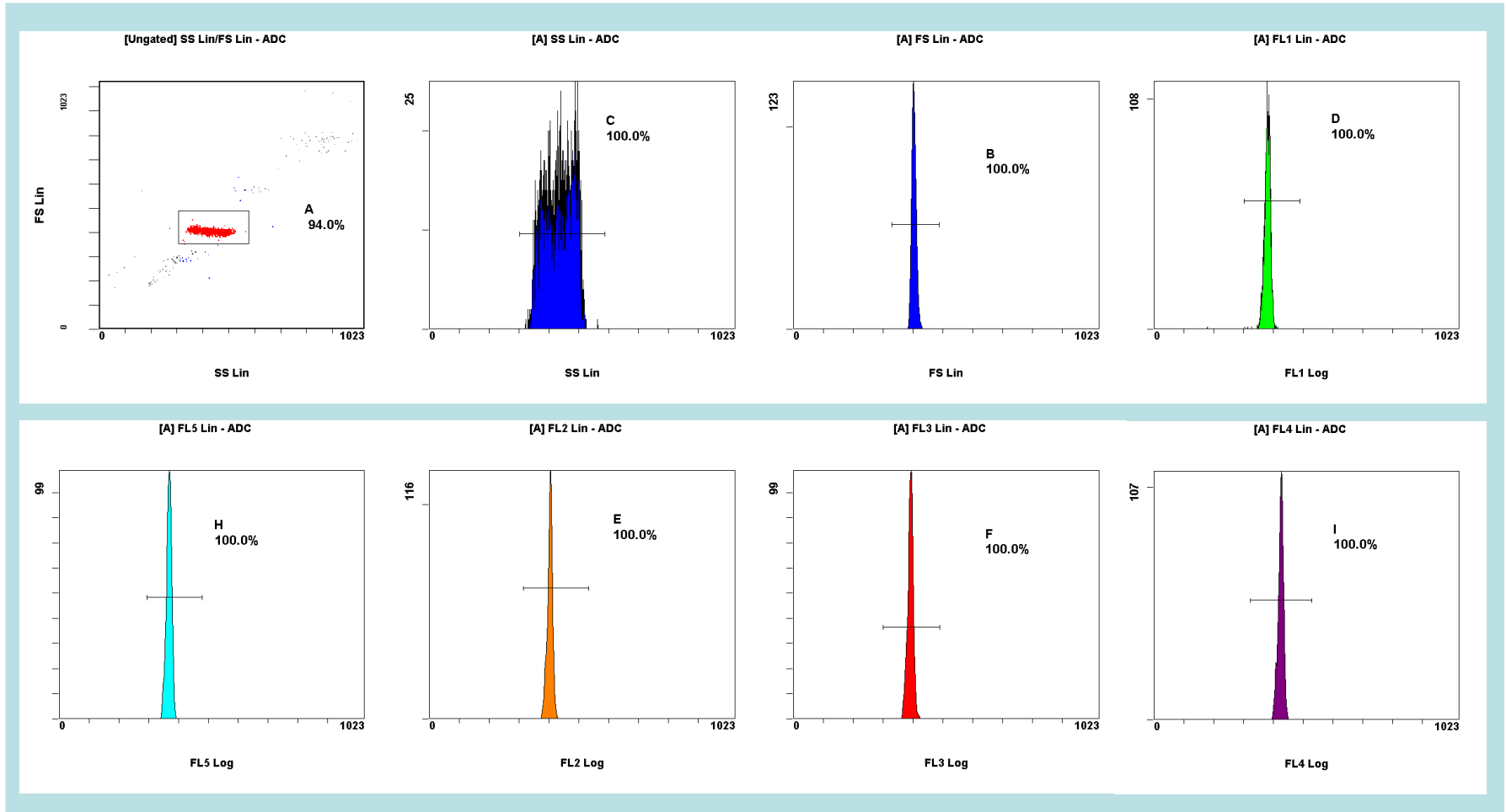


**HPCV**  
**FPCV**  
**HPCV < FPCV**



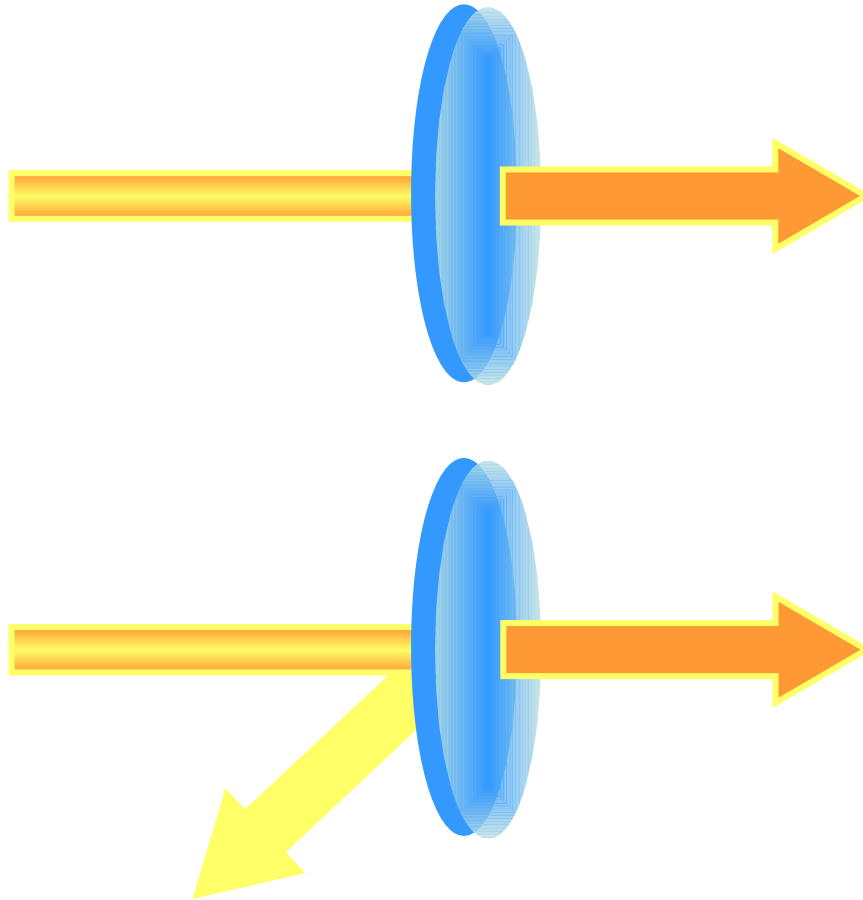
# CONTROLE DE ALINHAMENTO

Objetivo: maximiza intensidade  
minimiza variabilidade



Realizar em novos instrumentos, manutenção e reparos

# FILTROS E ESPELHOS

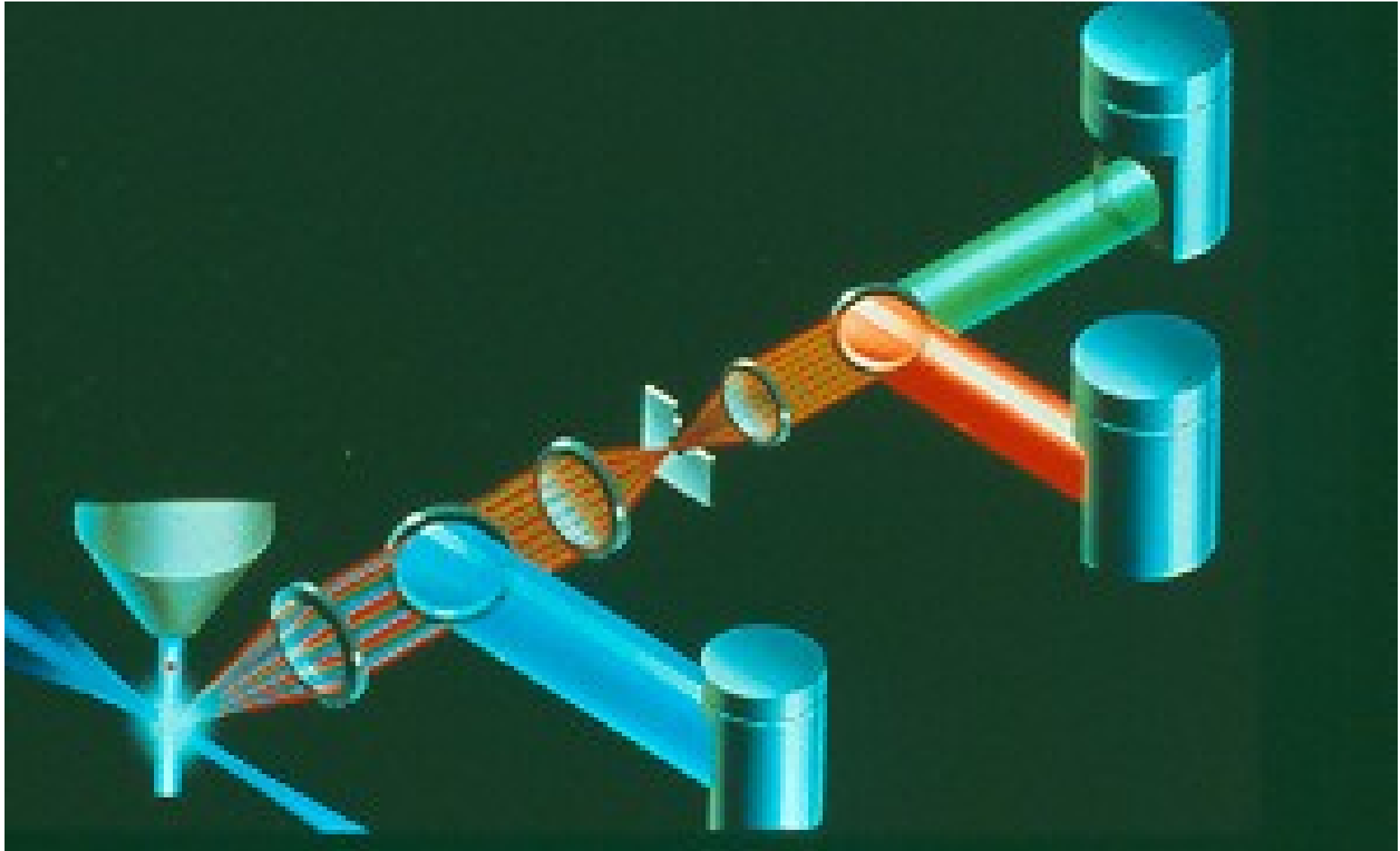


# FILTROS E ESPELHOS

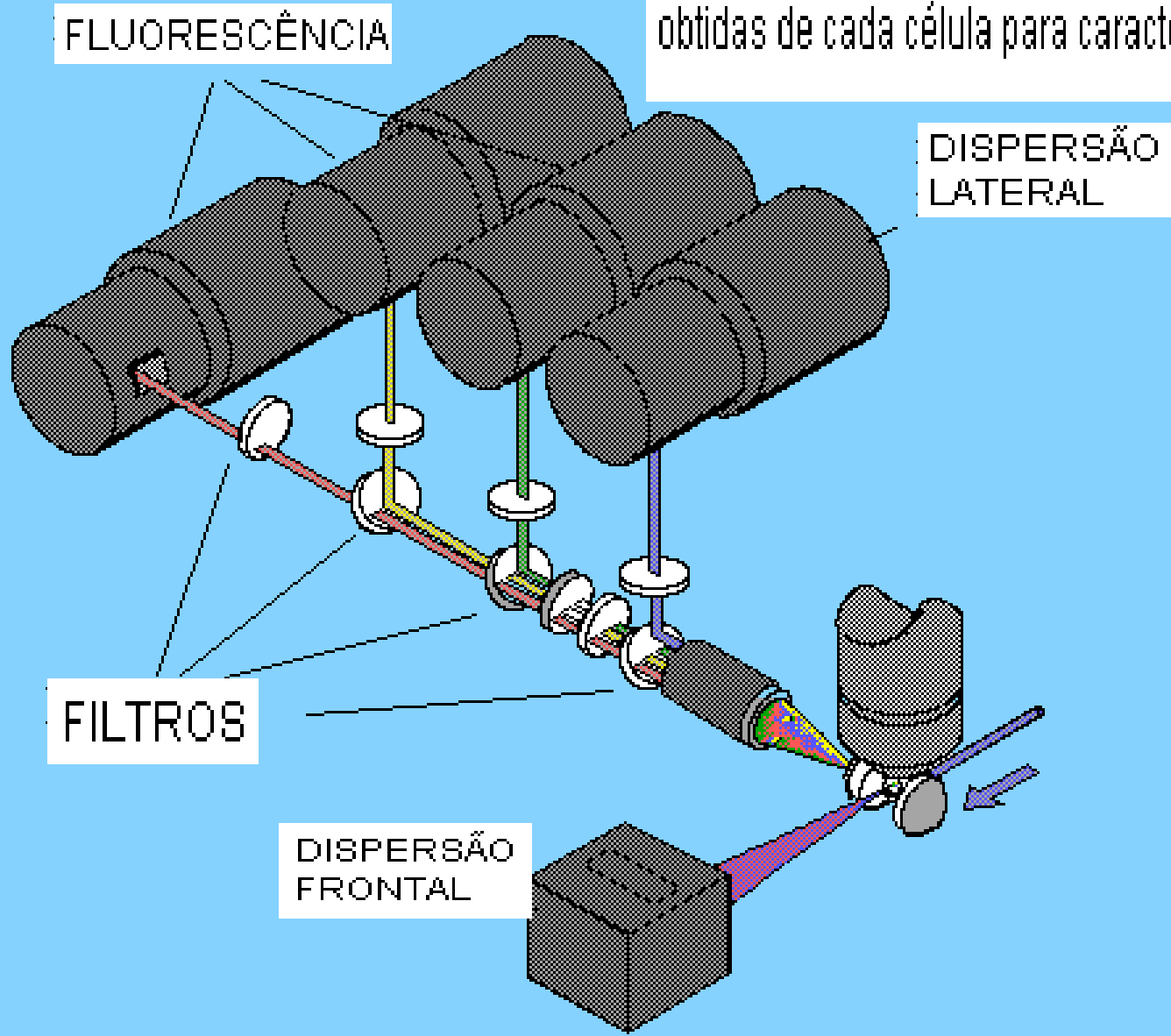
## NOMENCLATURA

- SP  $N$  SHORTPASS  $N$
- LP  $N$  LONGPASS  $N$
- BP  $N$  BANDPASS  $N$
- BK  $N$  BLOCK  $N$
- DL  $N$  DICHROIC LONG  $N$

# CONFIGURAÇÃO ÓTICA



As medidas simultâneas da dispersão frontal, dispersão lateral e fluorescências podem ser obtidas de cada célula para caracterizá-las.



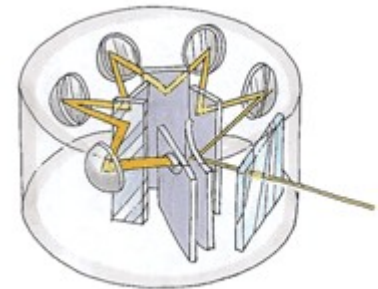
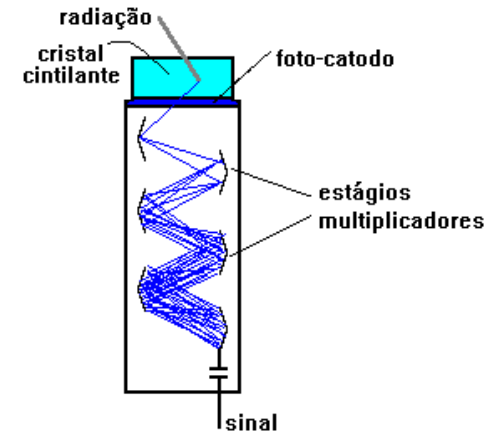
# Fotomultiplicadores

*Tube fotomultiplicador*

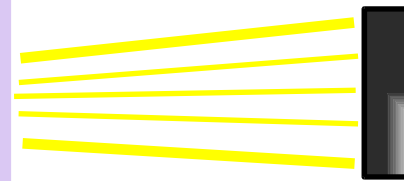
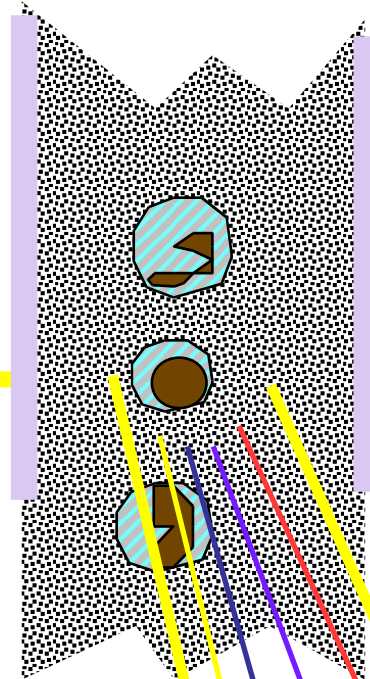
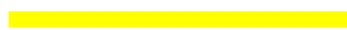
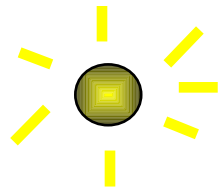
*Produção de luz no cristal cintilante:*

*Conversão de luz em elétrons*

*Amplificação do sinal*



# Fotomultiplicadores

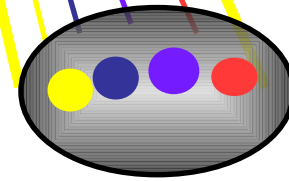


FSC Sensor

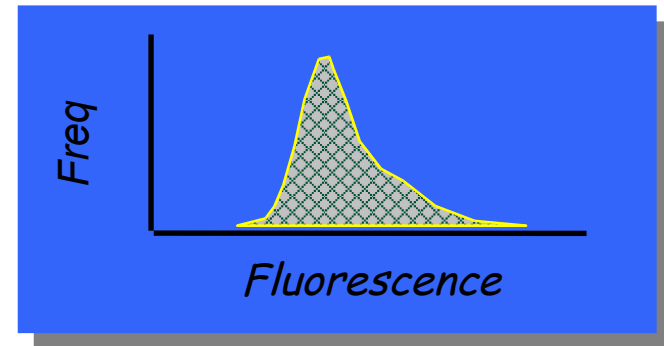
Impulsos elétricos  
Sinais analógicos

Sinais digitais

Distribuição por frequência  
Histogramas



Detector de Fluorescência  
(FL1, FL2, FL3 e FL4)  
(tubos fotomultiplicadores)



# Desempenho dos Detectores

- Quantificar repetidamente ( $n > 10$ ) o valor relativo de um parametro para cada um dos fluorocromos.
- Ajustar a voltagem de cada detector para obter o mesmo valor relativo em cada determinação
- Calcular a media aritmetica da voltagem e usa-la como constante
- Vigiar e registrar flutuações diarias desse valor



# Linearidade

- validação de sensibilidade e linearidad
- Verificar a resposta do detector de linearidade e sensibilidade
- Realizar em novos instrumentos, manutenção e reparo
- Serie de beads com niveis de intensidade de fluorescencia pre definidos.

# Controle de Qualidade Interlaboratorial

Objetivo: - Comparar resultados com diversos instrumentos e reagentes disponíveis comercialmente

Assegurar a qualidade dos exames de C. Fluxo

- CAP, UKNEQAS, PELM (SBPC/ML)

# CAP: College of American Pathologists – [www.cap.org](http://www.cap.org)

2010 CITOMETRIA Nº amostras/Ensaio		Códigos CAP	Previsão Mes	Início no HIAE	VALOR \$
3 amostras	<b>C.Fluxo - DNA / Subpop. Linfoc.</b>	FL, FL1, FL2	Mar/Jun/ Out.	<b>1996</b>	\$1.476,00
2 amostras	<b>C. Fluxo- L &amp; Lymphoma</b>	FL3	Mar/Set.	<b>1996</b>	\$670,00
2 amostras	<b>Caracterização de L &amp; Lymphoma CD</b>	FL3CD	Fev/Ago.	<b>2007</b>	\$260,00
2 amostras	<b>C. Fluxo - CD34</b>	FL4	Abril/Out.	<b>2004</b>	\$544,00
2 amostras	<b>C. Fluxo – Interpretação somente</b>	FL5	Fev/Ago.	<b>2009</b>	\$236,00
7 amostras	<b>C. Fluxo - Calibração</b>	LN22	Abril/Out.	<b>2007</b>	\$658,00
2 amostras	<b>C. Fluxo - Imunofenotipagem HPN</b>	PNH	Abril/Out.	<b>2006</b>	\$488,00
2 amostras	<b>C. Fluxo - Imunofenotipagem HPN –G.B.</b>	PNHW	Abril/Out.	<b>2006</b>	\$536,00
				<b>SUBTOTAL</b>	<b>\$4.868,00</b>

*FL, FL1, FL2: Conteúdo de DNA e Análise do Ciclo celular / IPP Linfocitária –*

*FL3: Leucemia/Linfoma –*

*FL3 CD: interpretação --*

*FL4: CD34 --*

*FL5: Interpretação -*

*PNH:GV/GB-*

*Calibração:*

## **FL1: Imunofenotipagem Linfocitária - > 650 participantes**

### **Variáveis pré analíticas:**

Leucometria e/ou contagem absoluta (*beads*)  
CD45 x SSC ou correção dos resultados com CD45  
Plataforma única ou dupla  
Método de Preparação

### **Variáveis analíticas:**

Número de laboratórios participantes por equipamento  
Média, Desvio Padrão, Coeficiente de Variação, Mediana, Valor Mínimo e Máximo  
Analitos  
CD2/CD3/CD3-CD4/CD5/CD3-CD8/CD19/CD20/CD3(-)-CD16(+)/CD3(-)-CD56(+)  
CD3(-)/CD56(+)/CD16(+)

### **Discussão e comentários do Ensaio realizado**

## ***FL2: Conteúdo de DNA e Análise do Ciclo Celular*** - >85 participantes

### **Variáveis pré analíticas:**

Número de Células analisadas

Método/Condição/pH

Equipamento e Software de análise

### **Variáveis analíticas:**

CV do Pico  $G_0/G_1$

Relação  $G_2/G_1$  (Nº canal da Fluorescência)

CV do Pico Diplóide  $G_0/G_1$

Porcentagem de Células do Pico Diplóide  $G_0/G_1$

Nº de Picos Aneuploides identificados

Índice de DNA do Pico Aneuploide

CV do Pico Aneuploide

Relação  $G_2/G_1$  do Pico Aneuploide

Porcentagem da Fase S

## FL3: Leucemia / Linfoma- > 420 participantes

- **VARIÁVEIS PRÉ ANALÍTICAS:**

Viabilidade Celular e Metodologia empregada

**Gating** utilizado: **CD45 x SSC**, FSC x SSC, CD45 x Linfocitos, Mononucleares x FSC/SSC, Linfócitos x FSC/SSC, sem *gate*

Controle Isotípico: **IgG1**, IgG2a, Igm, IgG2b, IgG2a+2b, não usa e outros

Fluorocromos /Isotipos: **FITC**, **PE** ou RD1, PE-Cy5 ou PC5, APC, ECD, PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7 ou PC7, TC - tricolor, Cy-Cromo e outros.

- **VARIÁVEIS ANALÍTICAS:**

Interpretação das Expressões de Anticorpos:

### **Distribuição do Anticorpo**

**Negativo:** sem diferença significativa em relação a população controle

**Positivo:** Significativamente maior do que o controle

**Parcialmente Expresso:** Um subtipo da população de interesse é positiva

### **Intensidade de Fluorescência do Anticorpo**

Relativo a população hematolinfóide normal mais próxima, por exemplo: se o CD5 está expresso na população de células B da LLC, a intensidade deveria ser comparada com a expressão do CD5 em linfócitos T normais.

**Fraco / Forte / Heterogêneo / Normal / Não aplicável (deve ser utilizado quando a**

## FL4: Quantificação de células CD34 - >100 participantes

- **Variáveis pré analíticas:**

Equipamento

Estratégia de *gating* (ISHAGE, BD-ProCount, Milan Mulhouse,  
Linfócitos x CD45 e SSC)

Plataforma única / dupla

- **Variáveis analíticas:**

G.B., nº de Eventos de CD45(+) coletados,

% CD45(+), % e número absoluto de CD34(+)

## **FL5 : Citometria de Fluxo – Interpretação >27 participantes**

**História Clínica, dados laboratoriais, Histogramas realizados  
Solicita interpretação da**

- Distribuição de Anticorpos
- Intensidade de Fluorescência

**Solicita diagnóstico**

**Realiza discussão e comentários sobre os resultados**

**Vantagem: treinamento na interpretação dos histogramas**



## FL3CD

**Caracterização de Leucemia/Linfoma-CD Rom >140 participantes**

### **Informações pré analíticas**

Equipamento

Software de Análise: BD FACSDiva, Cell Quest, Expo32, Flow Jo, Paint-a-gate, FSCEXpress RXP, Win List

Na análise utiliza morfologia ?

Quantas cores: 2,3,4,5 mais de 5

### **Informações analíticas**

Como define a população atípica/neoplásica: cels.B, celsT, Blastos ou linfócitos ou Grandes linfócitos (SSC,CD45xSSC)

Distribuição e Intensidade de Fluorescência por CD

**Vantagem: treinamento na realização das análises (*gating*) e da interpretação dos histogramas**

## LN22

### Calibração e Linearidade do Citometro de Fluxo > 150 participantes

- **Informações pré analíticas**

Equipamento

Plataforma única ou dupla

- **Informações analíticas** – realizar duas análises por amostra

- **Objetivo de obter diferenças mínimas detectáveis em:**

Linfócitos T/CD3, Linfócitos T/ CD3/CD4, Linfócitos T /CD3/CD8,  
Números absolutos em plataforma única

# Imunofenotipagem Citometria de Fluxo HPN >120 participantes *G.V. / G.B.*

- **Informações pré analíticas**

Equipamento

Método de preparação

Anticorpos utilizados / fluorocromos

- **Informações analíticas**

CD55 e CD59 em G.V.

População presente / ausente

% de população (+) e (-)

# UKNEQAS : United Kingdom National External Quality Assessment Schemes [www.ukneqas.org.uk](http://www.ukneqas.org.uk)

2009 CITOMETRIA - UK NEQAS			Previsão Mês	Início no HIAE	VALOR \$
Nº de Amostras					
1 amostra	Imunofenotipagem Leucemia (Part 1 )		Fev/Abril Jun/Jul	<b>1998</b>	\$1.186,75
1 amostra	Imunofenotipagem Leucemia (Part 2)		Mar/Mai Jul/Ago	<b>2008</b>	\$1.175,00
2 amostras	CD34 Stem Cell Enumeration Scheme		Fev/Mar/ Abr/Jun/ Ago/Dez	<b>1997</b>	\$787,25
2 amostras	Paroxysmal nocturnal Haemoglobinurea		Fev/Abril Ago/Dez	<b>2004</b>	\$28,20
				<b>SUBTOTAL</b>	<b>\$3.177,20</b>

Iniciaremos Testes de proficiênciapara Doença Residual Mínima em 2010

# Imunofenotipagem Leucemia

## Parte 1>, Parte 2 > 230 participantes

- Parte 1 : Preparação e análise da amostra
- Parte 2 : Interpretação diagnóstica

- **Variáveis pré analíticas:**

Equipamento

Método de detecção: direto / indireto

Número de células analisadas

Reagente hemolisante

Ac monoclonais – fornecedor

Fluorocromo

Tempo de incubação

Gating utilizado

- **Variáveis analíticas:**

Antígenos recomendados e opcionais

Analitos: resultados qualitativo (positivo/negativo)

resultados quantitativo (porcentagem por Atc)

## **Parte 2**

Interpretação diagnóstica

Linhagem, Subclassificação, Diagnóstico

Número de laudos retornados e % no consenso

- **Resultados do consenso**

Resultados Quantitativos: Mediana - Fornecedor de Ac. Monoclonal

Mediana – Equipamento

Mediana – Fluorocromo

Interpretação gráfica – distribuição dos resultados de cada anticorpo  
(dispersão)

- **Conclusão e Discussão**

**Interpretação do diagnóstico com discussão**

**Outros exames realizados para elucidação diagnóstica**

# Quantificação de Células CD34 >240 participantes

## HPN >60 participantes

- **Variáveis pré analíticas e analíticas:**  
Semelhante ao CAP

### Comentários dos resultados

Mediana, quartil inferior, quartil superior

Pontuação acumulada das últimas 3 amostras

Desempenho (satisfatório/insatisfatório)

Envia os resultados do consenso: mediana e intervalo centil.

Interpretação gráfica – distribuição visualizando a dispersão

### HPN difere do CAP:

GV - Clone CD55 HPN Célula tipo I, II,III

Clone CD59 HPN Célula tipo I, II,III

GB - Clone CD55, CD59, outros anticorpos: CD16,CD66b, CD24,

Interpretação gráfica – distribuição visualizando a dispersão

## SUBCOMITÊ DE CONTROLE DE QUALIDADE

**Alex Freire Sandes - [alex.sandes@fleury.com.br](mailto:alex.sandes@fleury.com.br) ;**  
**Annelise Corrêa Wengerkiewicz - [annelisecw@yahoo.com.br](mailto:annelisecw@yahoo.com.br) ;**  
**Ana Paula Azambuja - [apazamb@gmail.com](mailto:apazamb@gmail.com)**  
**Igor Couto da Cruz – [igorflowcitometry@yahoo.com.br](mailto:igorflowcitometry@yahoo.com.br);**  
**Marta Onésia Vianna - [martaviana@dasa.com.br](mailto:martaviana@dasa.com.br) ;**  
**Mihoko Yamamoto - [yamamoto@unifesp.br](mailto:yamamoto@unifesp.br) -**  
**Nydia S. Bacal – [nsbacal@einstein.br](mailto:nsbacal@einstein.br)**