

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 (guidelines)

CITOMETRO DE FLUXO

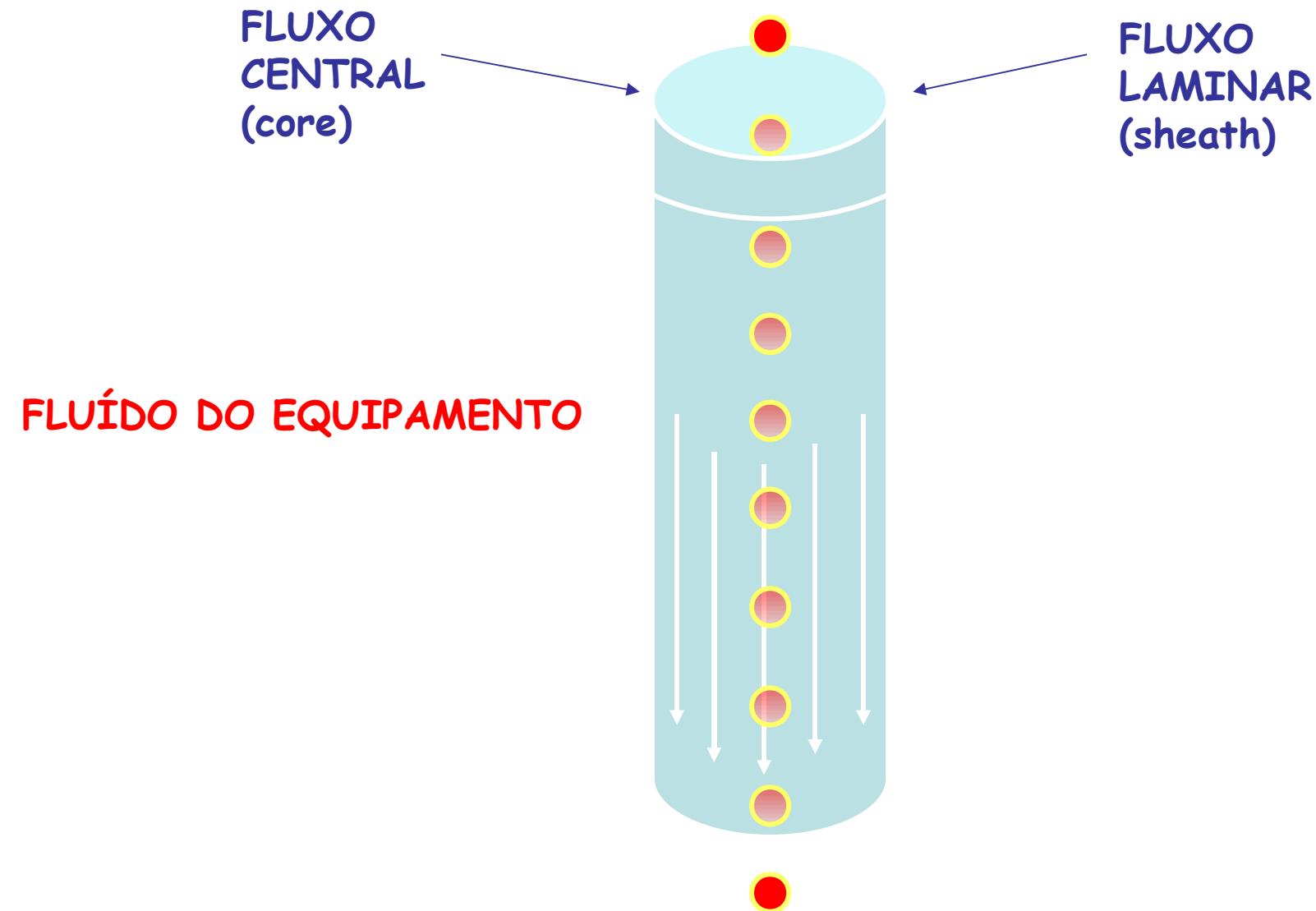
HIDRÁULICO
ÓPTICO

Fontes de Luz (LASER)
Condensadores
Espelhos/Filtros
Fotomultiplicadores

INFORMÁTICA



HIDRÁULICO



CÂMERA DE FLUXO

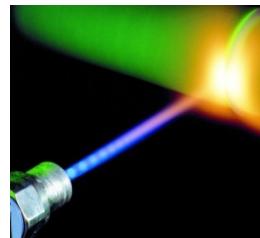


FOCO HIDRODINÂMICO

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	λ (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

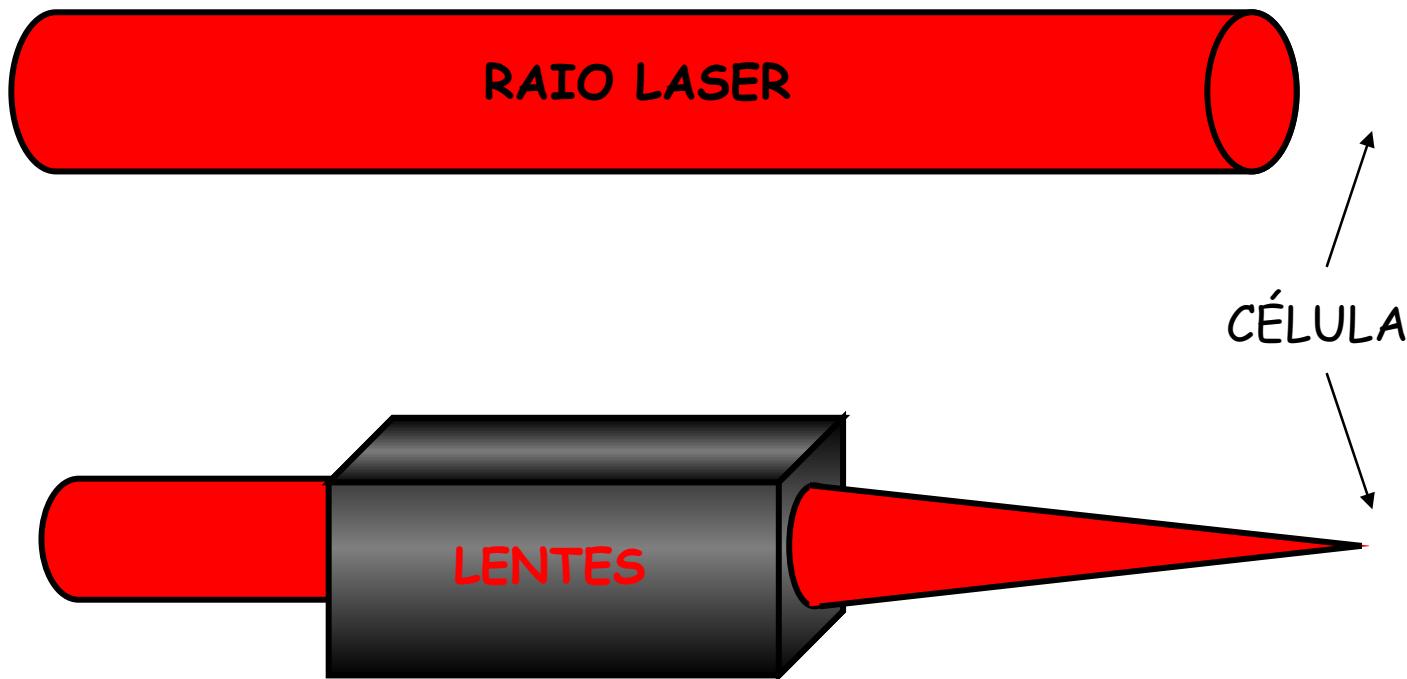
Laser a líquido

	Cor	λ (nm)		
Coumarin	C30	verde	504	
Rhodamine		6G	IV	570 a 650

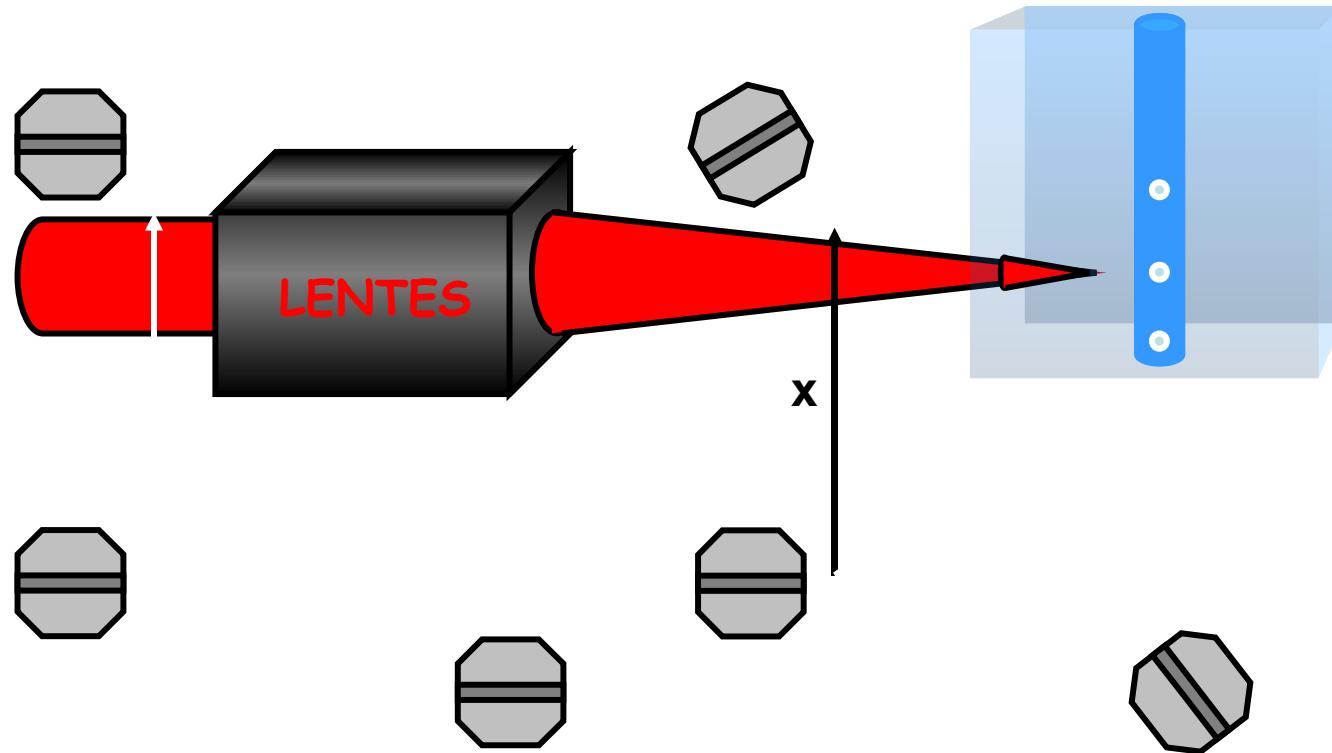
	Laser a gás "Excimer"	Cor	λ (nm)
Cloreto de criptônio		UV	222
Cloreto de xenônio		UV	308
Fluoreto de argônio		UV	193
Fluoreto de criptônio		UV	248
Fluoreto de xenônio		UV	351

ENFOQUE HIDRODINÂMICO- alinhamento óptico

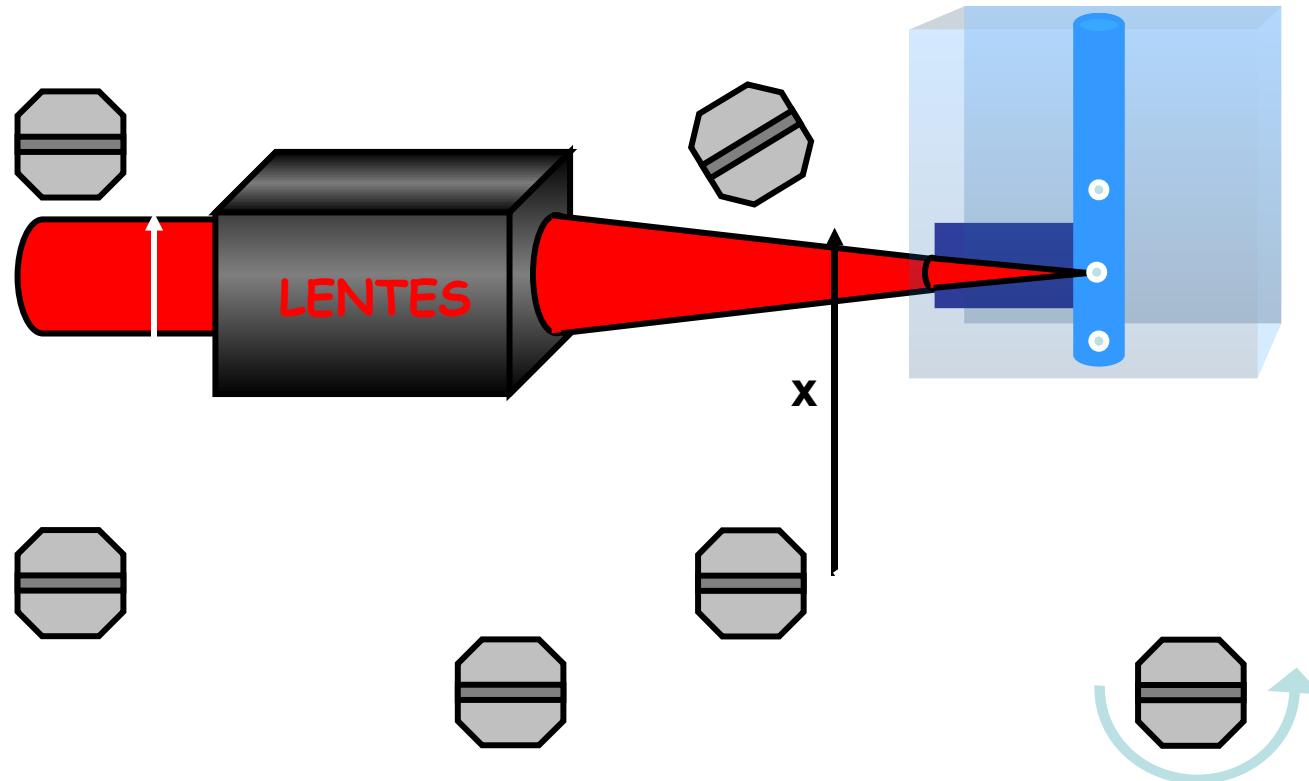
"Beam shaping"



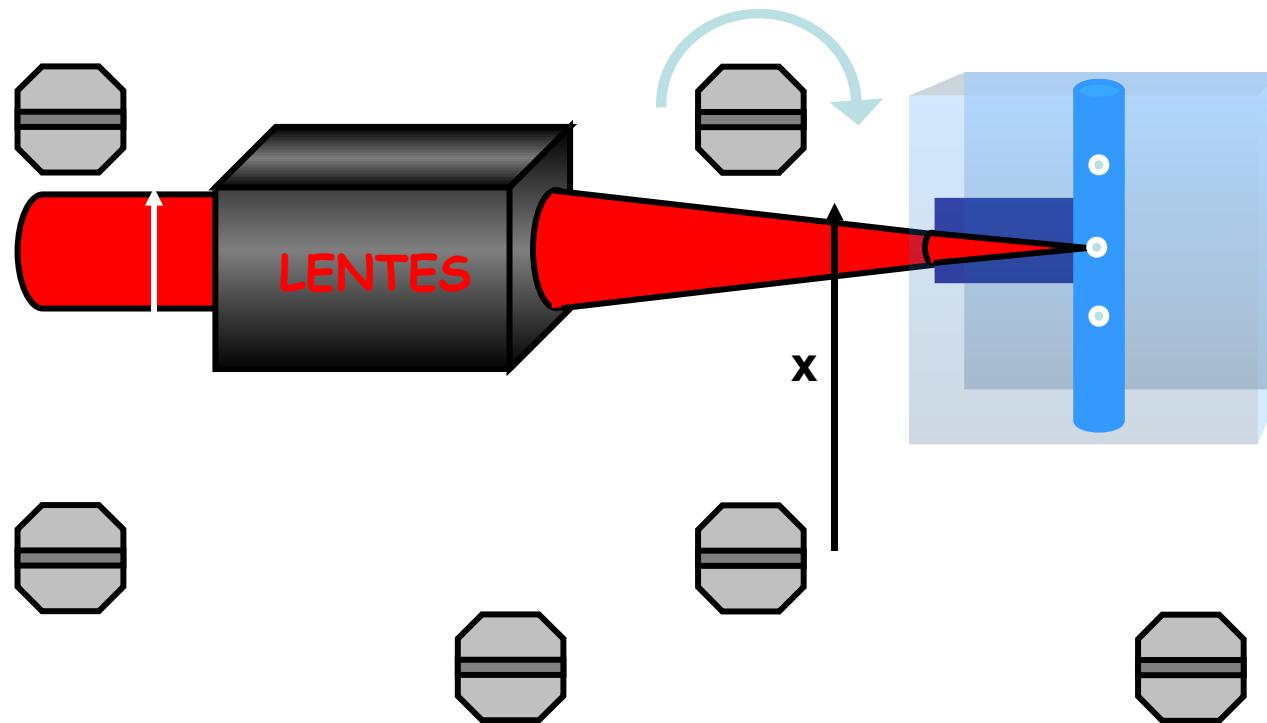
ALINHAMENTO ÓPTICO



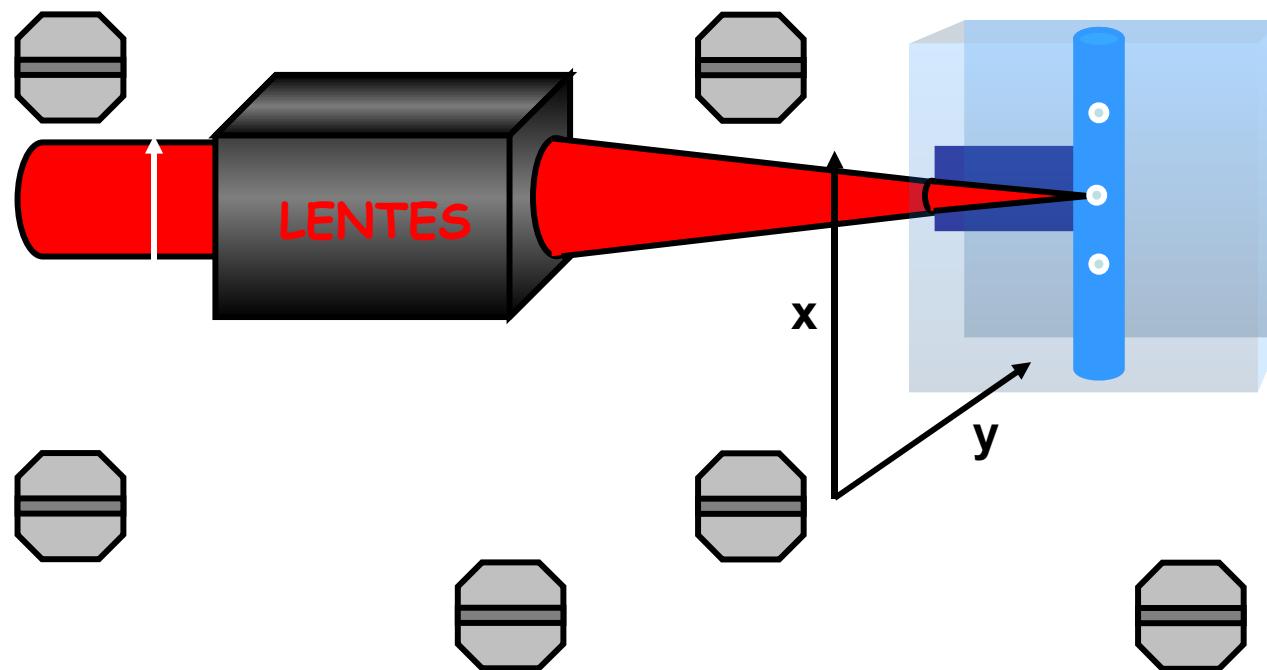
ALINHAMENTO ÓPTICO



ALINHAMENTO ÓPTICO

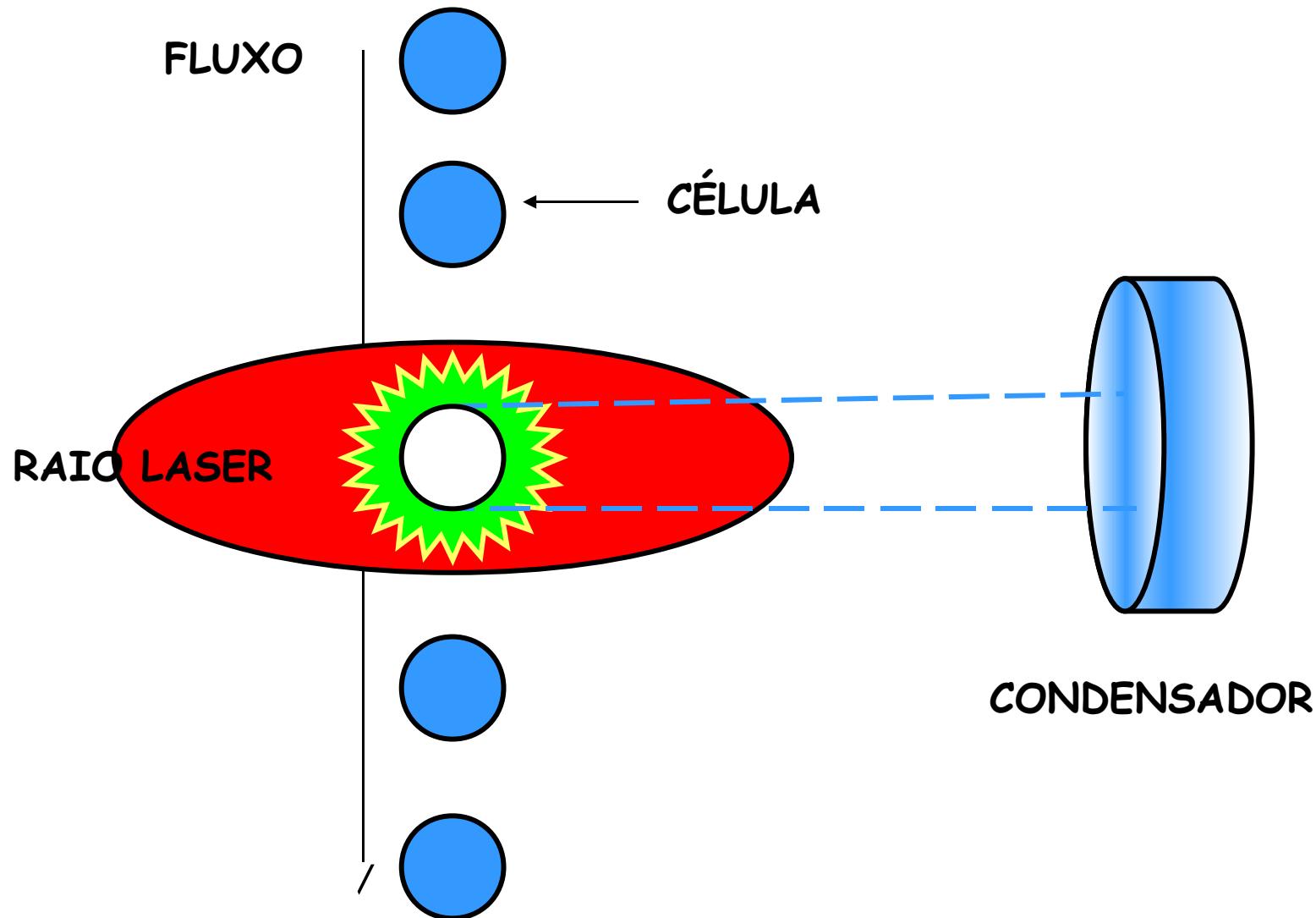


ALINHAMENTO ÓPTICO



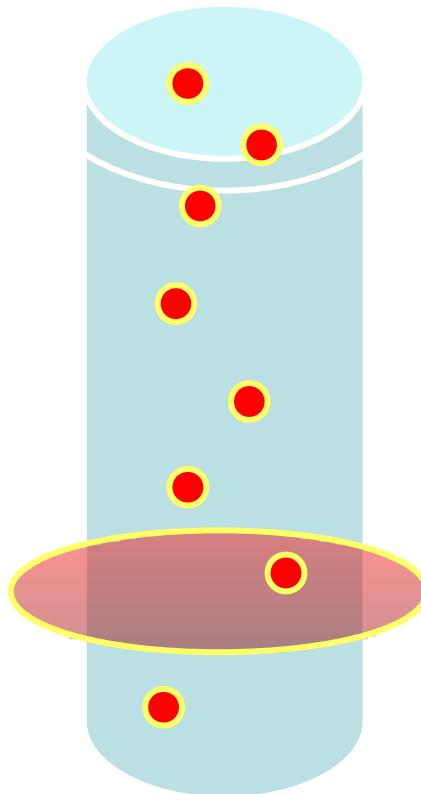
ENFOQUE HIDRODINÂMICO

"Beam shaping"

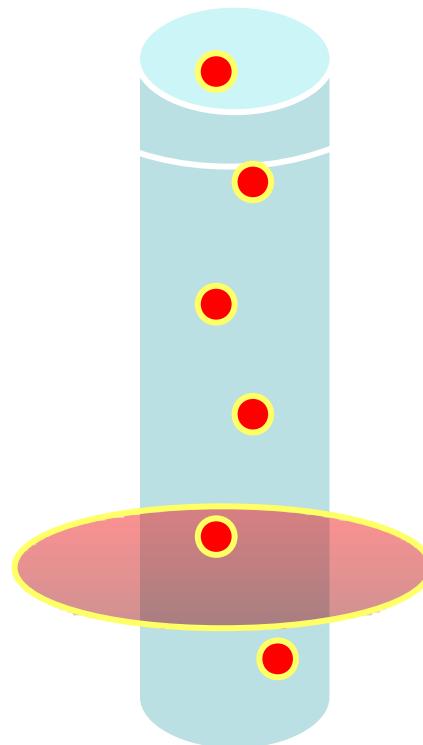


VELOCIDADE DO FLUXO

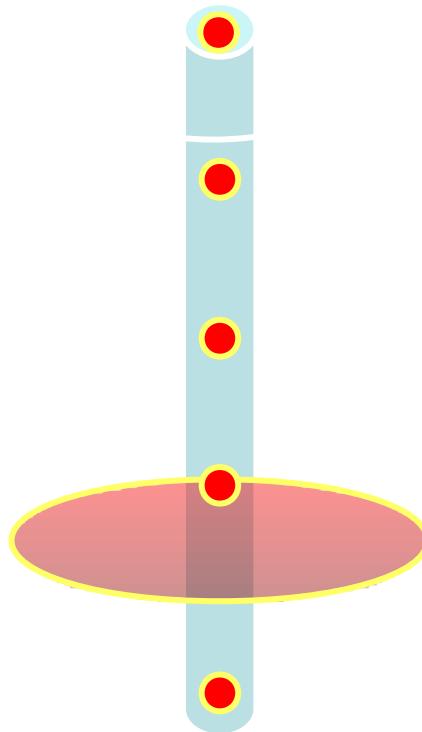
ALTA

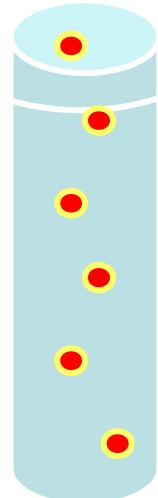
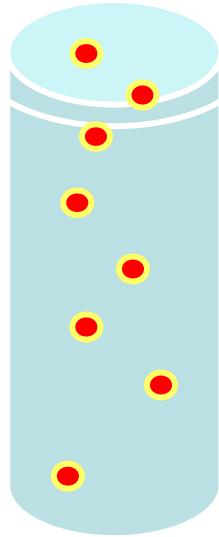


MÉDIA

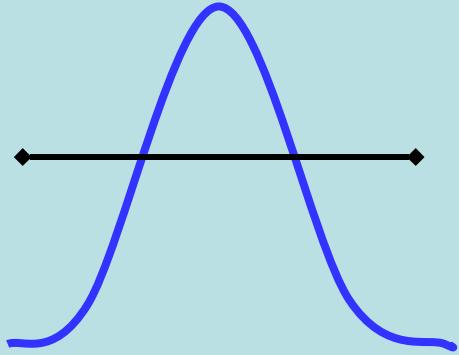


BAIXA

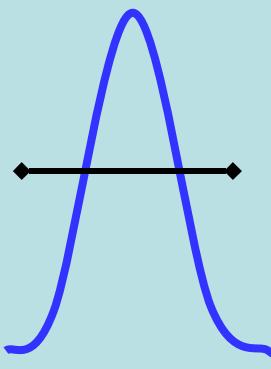




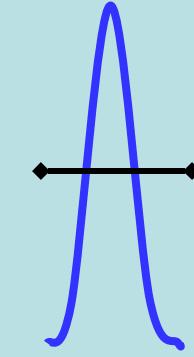
$CV=10\%$



$CV=5\%$

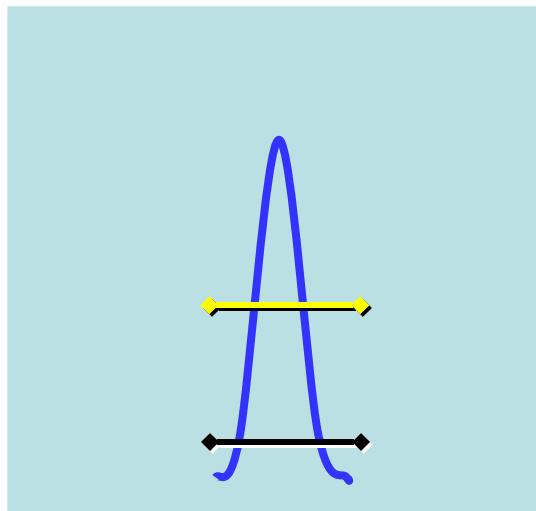


$CV=1\%$



ALINHAMENTO ÓPTICO

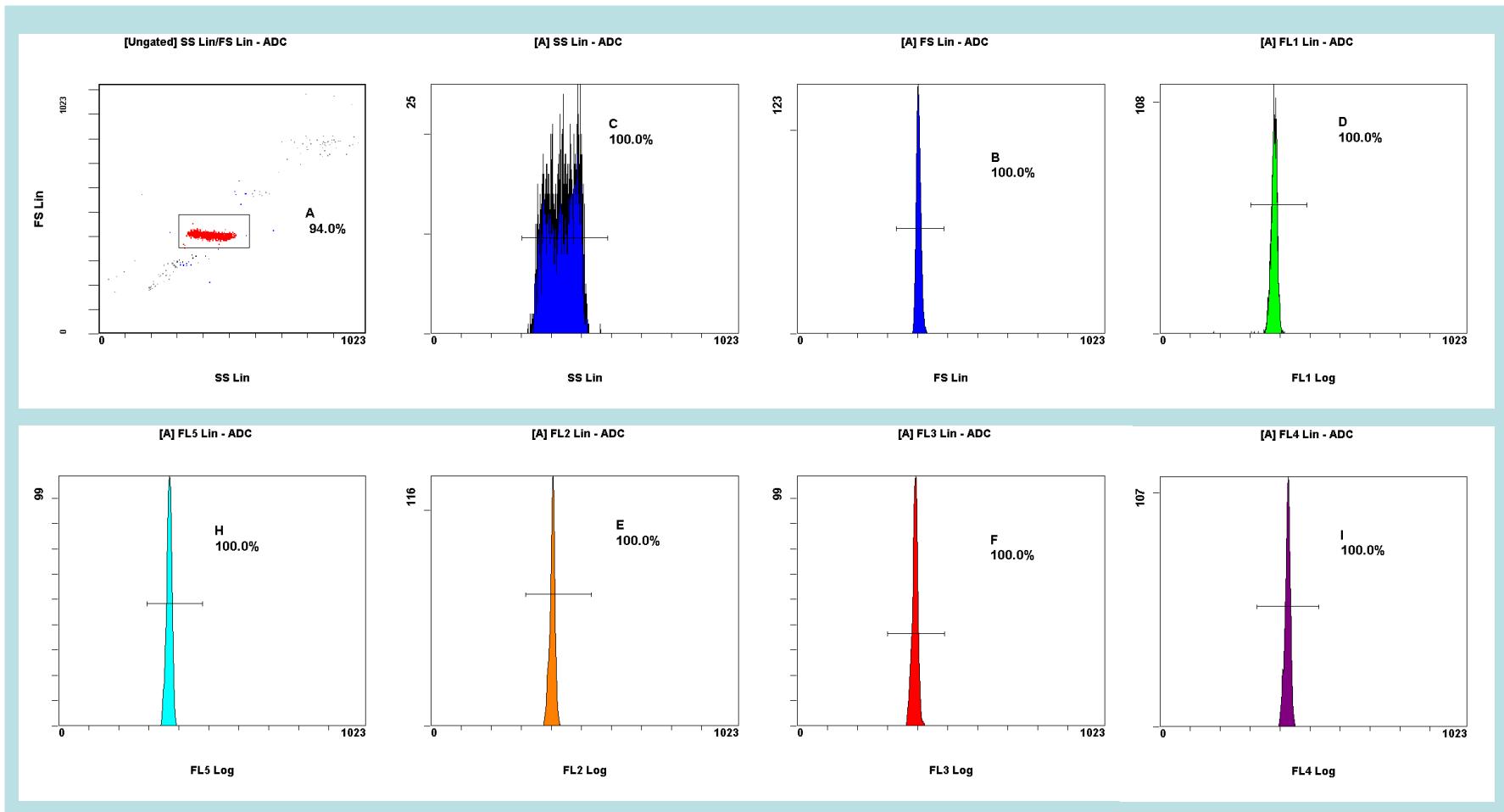
- VELOCIDADE DE FLUXO LENTA
- RECONTAGEM ≥ 1500 EVENTOS
- COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (HPCV) $\leq 2\%$
em todos os parâmetros



HPCV
FPCV
HPCV < FPCV

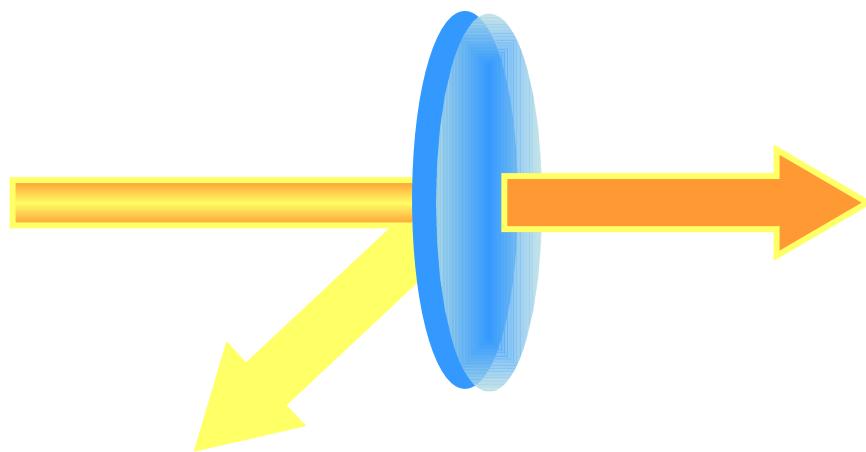
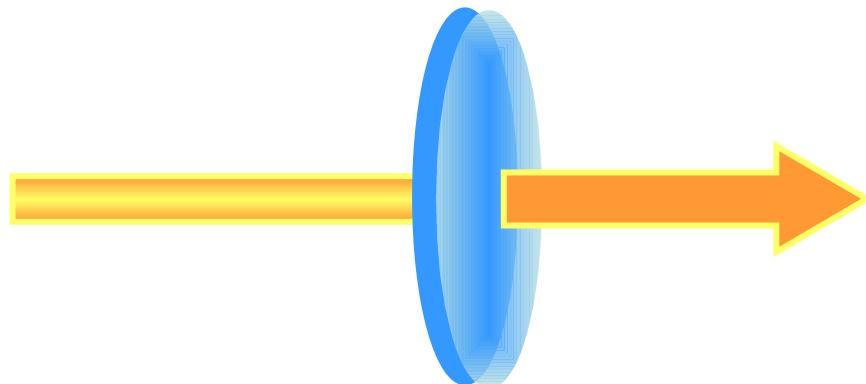
CONTROLE DE ALINHAMENTO

Objetivo: maximiza intensidade
minimiza variabilidade



Realizar em novos instrumentos, manutenção e reparos

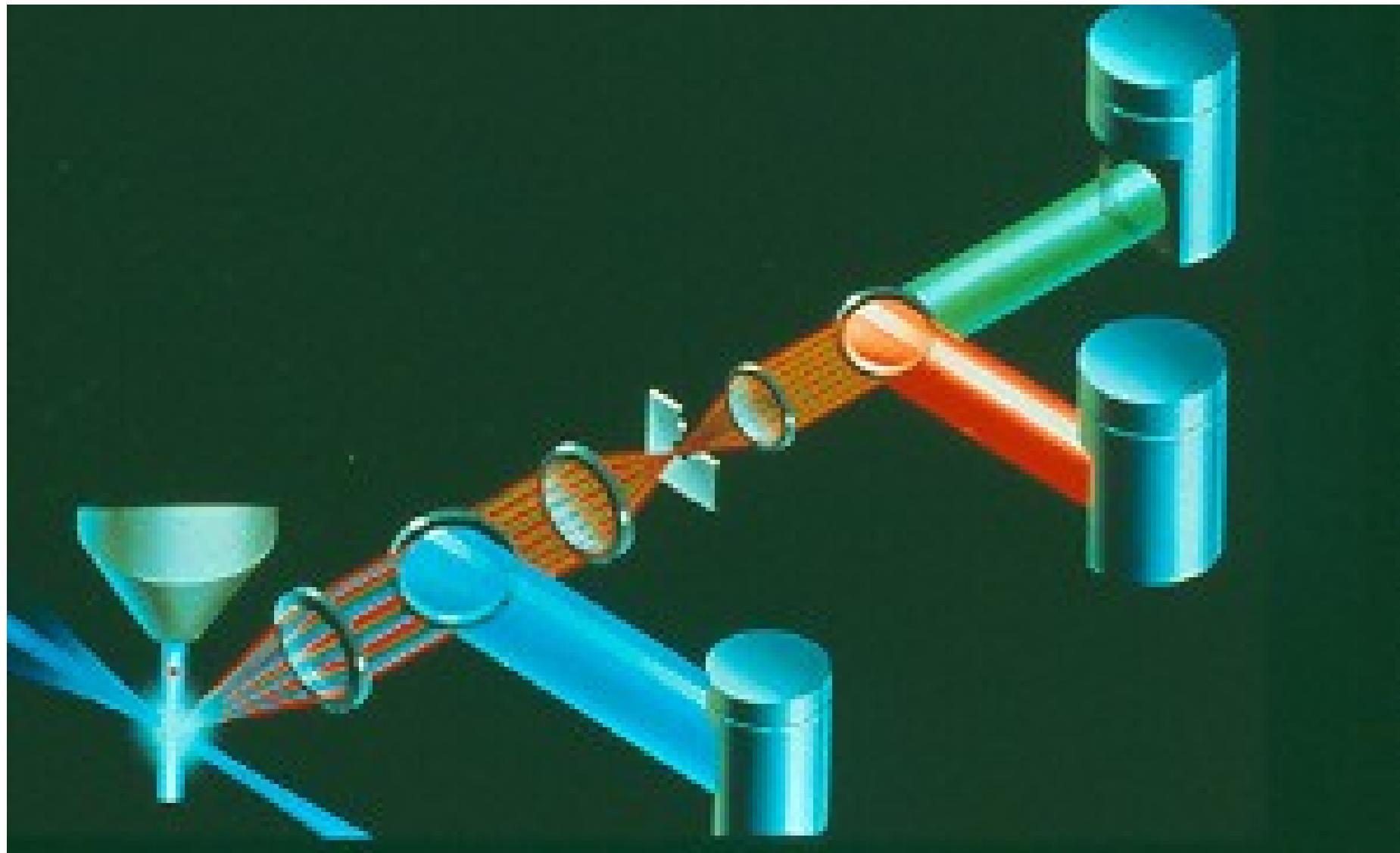
FILTROS E ESPELHOS



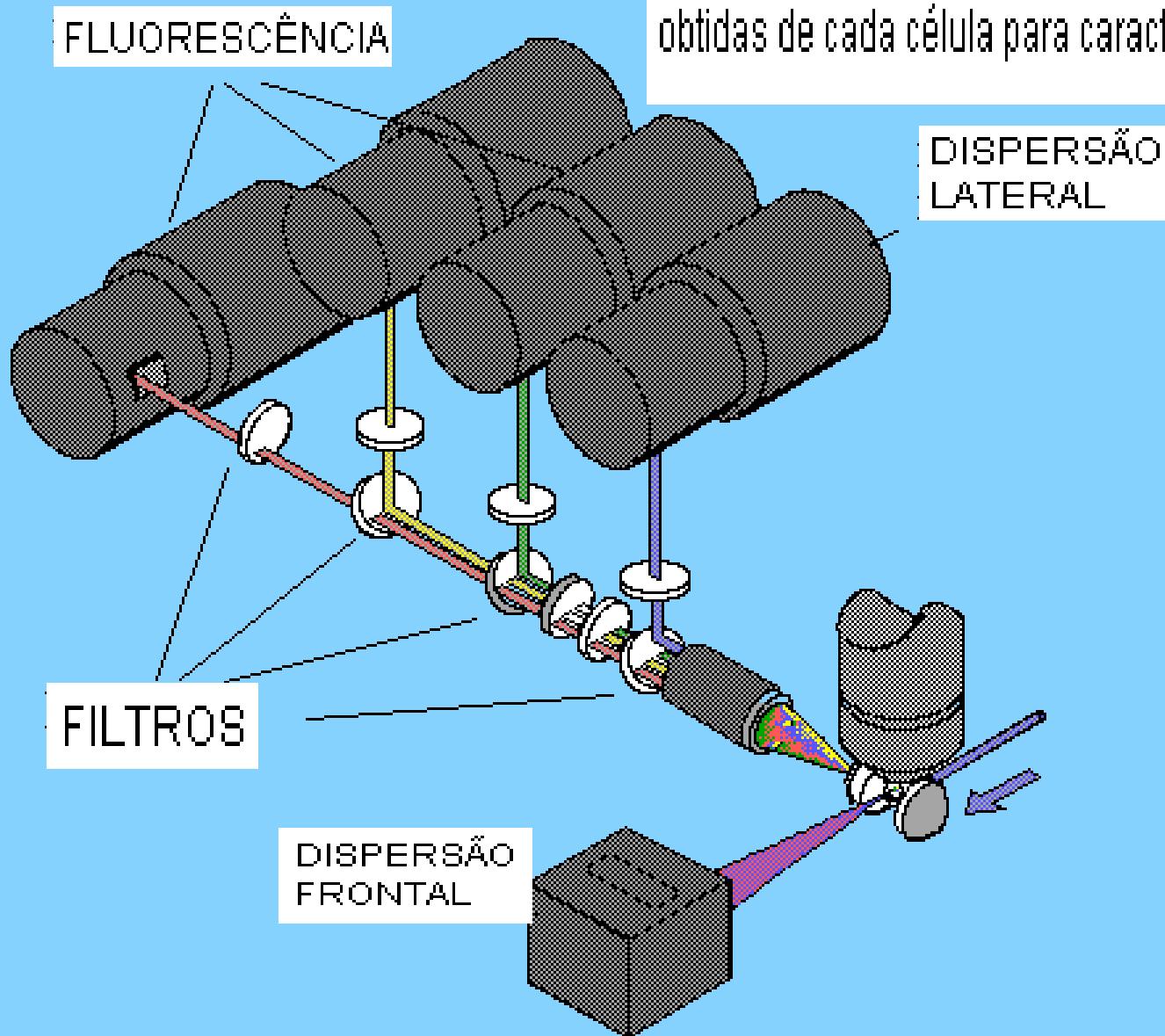
FILTROS E ESPELHOS NOMENCLATURA

- 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.



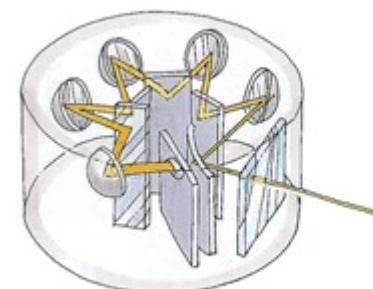
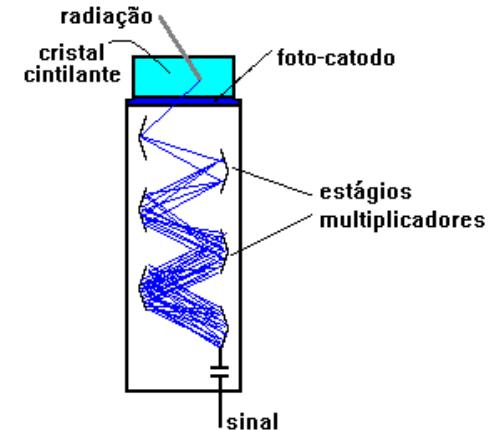
Fotomultiplicadores

Tubo fotomultiplicador

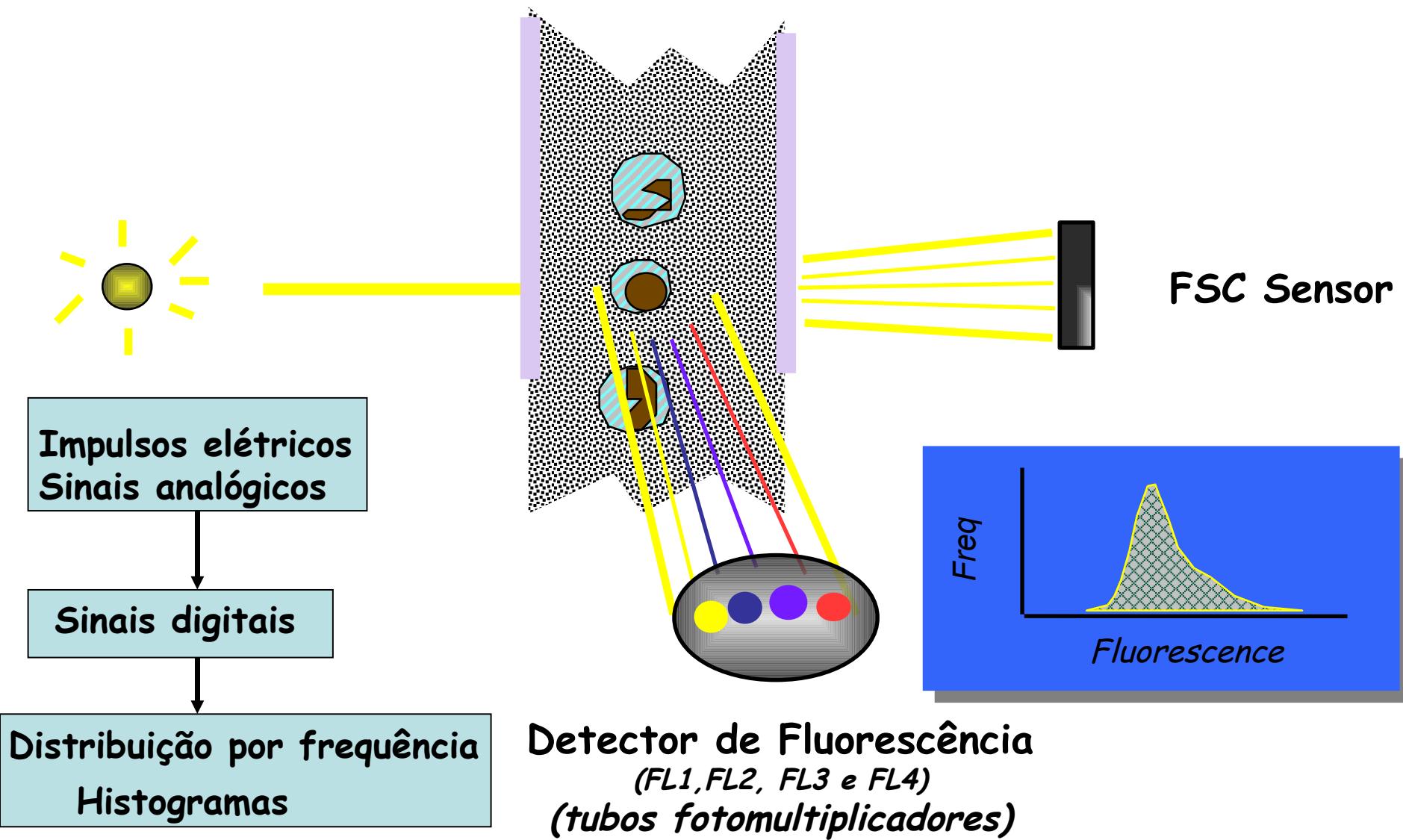
Produção de luz no cristal cintilante:

Conversão de luz em elétrons

Amplificação do sinal



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 diárias desse valor

Linearidade

- validação de sensibilidade e linearidade
- Verificar a resposta do detector de linearidade e sensibilidade
- Realizar em novos instrumentos, manutenção e reparo
- Serie de beads com níveis de intensidade de fluorescência 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

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

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

FL3: Leucemia/Linforma –

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 suptipo 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

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

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

Iniciaremos Testes de proficiênciapara Doença Residual Minima 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 ultimas 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 ;

Annelise Corrêa Wengerkievicz - annelisecw@yahoo.com.br ;

Ana Paula Azambuja - apazamb@gmail.com

Igor Couto da Cruz – igorflowcitometry@yahoo.com.br;

Marta Onésia Vianna - martaviana@dasa.com.br ;

Mihoko Yamamoto - yamamoto@unifesp.br -

Nydia S. Bacal – nsbacal@einstein.br