

Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta

InformaçõesDOCUMENTO DA QUALIDADE - Fiocruz Ceará

Esta IT estabelece procedimentos para a operação adequada do equipamento BD FACSCelesta.
Documento vinculado: FORM.FIOCRUZCE.409.0002

Justificativa de Revisão

Emissão inicial.

Propriedades

Código:	IT.FIOCRUZCE.409.0007	Estrutura:	Cultura de Células
Versão:	1	Tipo:	DOCX/PDF
Categoria:	INSTRUÇÃO DE TRABALHO	Data Versão:	10/11/2023
Verificador:	Clarice Gomes e Souza Dabes, Fatima de Cássia Evangelista de Oliveira	Data Edição:	n/d
Aprovador:	Clarissa Romero Teixeira	Data Criação:	17/07/2023
Elaborador:	Daniel Pascoalino Pinheiro	Acessos:	5
Validade:	10/11/2026	Forma:	REPOSITÓRIO
Vigência:	10/11/2023	Status:	Disponível
Distribuidor:	Anna Carolina Machado Marinho, Clarice Gomes e Souza Dabes	Anexos:	n/d

Atributos

Fiocruz Ceará_ Outros	Classificação SIGDA: 013.1
Elaboradores: Sarah Sant'Anna Maranhão	

Publicação

Ação	Responsável	Data Limite	Data Ação
Verificação	Fatima de Cássia Evangelista de Oliveira	17/07/2023	21/07/2023
Aprovação	Clarissa Romero Teixeira	02/08/2023	10/11/2023

Subscrição

Nomes: n/d

Documento(s) Vinculado(s):

Código -
Documento: n/d

Requisitos 0

n/d

n/d

n/d

n/d

Lista de Distribuição

Nº	Responsável	Data Impressão	Data Distribuição
n/d	n/d	n/d	n/d
n/d	n/d	n/d	n/d
n/d	n/d	n/d	n/d
n/d	n/d	n/d	n/d

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007
	REVISÃO: 1
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1

SUMÁRIO

1. OBJETIVO
2. CAMPO DE APLICAÇÃO
3. RESPONSABILIDADE
4. DEFINIÇÕES
5. SIGLAS
6. PROCEDIMENTO
7. REFERÊNCIAS
8. HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES
9. ANEXOS

1. OBJETIVO

Esta IT estabelece procedimentos para a operação adequada do equipamento BD FACSCelesta™.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Esta IT aplica-se ao responsável técnico e usuários treinados para uso do equipamento BD FACSCelesta™.

3. RESPONSABILIDADE

3.1 – Do responsável técnico / tecnologista

- a) Verificar se o equipamento está sendo operado corretamente de acordo com as instruções das ITs referentes ao uso do equipamento;
- b) Verificar o registro de uso do equipamento (logbook);
- c) Realizar a limpeza quinzenal do equipamento;
- d) Garantir que todas as regras de uso definidas nesta IT estão sendo cumpridas;
- e) Cadastrar novos lotes de *beads* de calibração, assim como realizar o *baseline* dos mesmos;
- f) Realizar o *long-term shutdown* do equipamento, quando necessário.

3.2 – Do usuário treinado

- a) Operar o equipamento corretamente de acordo com as instruções detalhadas nesta IT;
- b) Após o uso, manter o *waste* vazio e o tanque de *FACS Flow* cheio, quando houver novos experimentos agendados;
- c) Registrar o uso do equipamento no logbook;
- d) Estar presente durante toda a execução do experimento;

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007
	REVISÃO: 1
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1

e) Registrar e sinalizar à liderança imediata qualquer alteração ou dificuldade no equipamento.

4. DEFINIÇÕES

Para efeito deste procedimento, são adotadas as seguintes definições:

4.1 - INSTRUÇÃO DE TRABALHO (IT): Documento do Sistema da Qualidade que padroniza a utilização de um equipamento, sistema informatizado ou instrução de trabalho (instruções para execução de tarefas), facilitando o seu uso e minimizando erros de operação.

4.2 - CYTOMETER SETUP AND TRACKING (CS&T): *Cytometer Setup and Tracking beads* são uma suspensão de fluoroesferas com tamanhos e intensidades de fluorescência uniformes. As *beads* são usadas no controle de qualidade do instrumento (QC) para caracterizar, rastrear e relatar medições de desempenho dos citômetros de fluxo da BD.

4.3 – FACS FLOW: Solução diluente, salina, tamponada e isotônica própria para utilização em equipamentos de citometria de fluxo.

4.4 – FACS CLEAN: Solução descontaminante para uso em citômetro de fluxo. Pode ser substituída por hipoclorito hospitalar 0,5%.

4.5 – FACS RINSE: Solução detergente para uso em manutenção de citômetros de fluxo.

5. SIGLAS

São usadas no texto deste documento as seguintes siglas:

IT – Instrução de Trabalho

POP – Procedimento Operacional Padrão

SO- Subunidade Organizacional

CS&T – Cytometer Setup and Tracking

6. PROCEDIMENTO

Todo usuário que tenha sido treinado e considerado apto para uso do citômetro deverá ter seu próprio usuário e senha para manter a integridade de dados. Fica vedado qualquer compartilhamento com terceiros desses dados de acesso ao sistema.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO	
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007	
	REVISÃO: 1	
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1	

6.1 Regras básicas de Uso do Citômetro BD FACSCelesta™

As regras aqui dispostas foram discutidas em reunião. Ata está disponível na rede e pode ser solicitada através do e-mail da qualidade: qualidade.fioce@fiocruz.br.

6.1.1 O uso do BD FACSCelesta™ deverá ocorrer apenas após treinamento do usuário com o responsável técnico / tecnologista, sendo considerado apto para utilização do equipamento.

6.1.2 Todos os experimentos realizados no equipamento BD FACSCelesta™ devem ser agendados em horário comercial. O agendamento deve ser solicitado através do preenchimento de formulário disponível no sistema Interact e envio do mesmo para o e-mail citometria.fioce@fiocruz.br.

6.1.3 O uso de iodeto de propídio não é recomendável para o BD FACSCelesta™. Caso o uso seja imprescindível, o usuário deverá seguir instruções específicas de preparo de amostra. Nesse caso, comunicar previamente o tecnologista responsável.

6.1.4 Todo usuário após o uso do BD FACSCelesta™ deve preencher o tanque de FACS Flow e esvaziar o *Waste*.

6.2 – Configuração do equipamento

Configuração do citometro BD FACSCelesta™: 3 lasers: Azul (488-nm); Violeta (405-nm) e Vermelho, (640-nm). Detectores: 488/10, 530/30, 575/25, 610/20 e 695/40 (azul); 450/40, 525/50, 610/20, 670/30 e 780/60 (violeta); 670/30, 730/45 e 780/60 (vermelho).

6.3 – Visão geral do equipamento



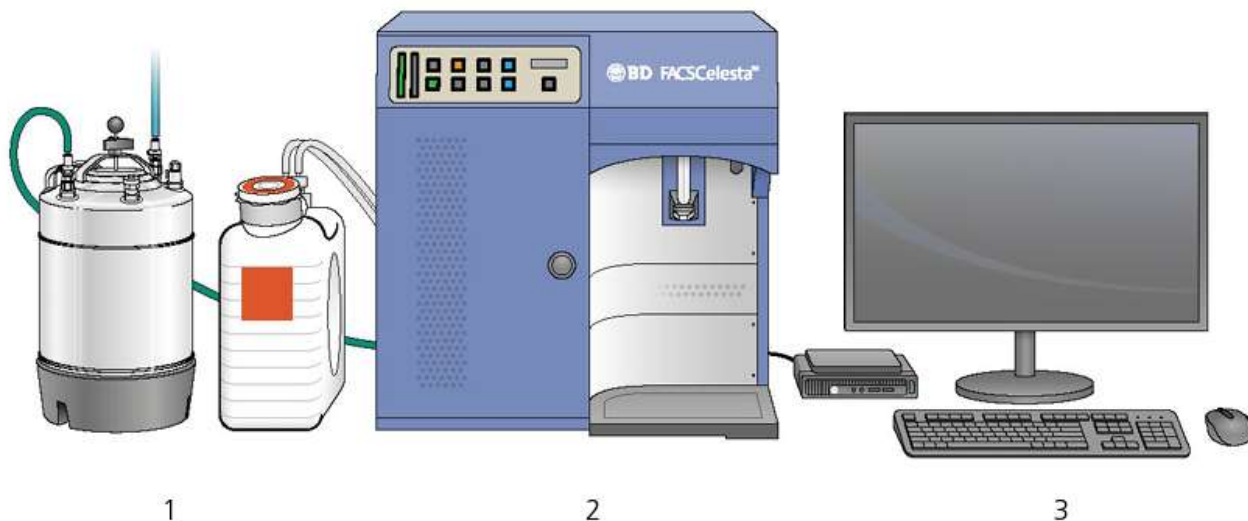
INSTRUÇÃO DE TRABALHO

TÍTULO:
Operação do Citômetro de Fluxo BD FACSCelesta

CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007

REVISÃO: 1

CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1



Número	Componente
1	Tanque de <i>FACS Flow</i> e <i>Waste</i>
2	Citômetro BD FACSCelesta™
3	Computador

Figura 1 – Componentes gerais do citômetro.

O citômetro FACSCelesta™ funciona por pressurização, cujo principal componente é o tanque (Figura 2). Algumas precauções devem ser tomadas ao manusear o tanque como:

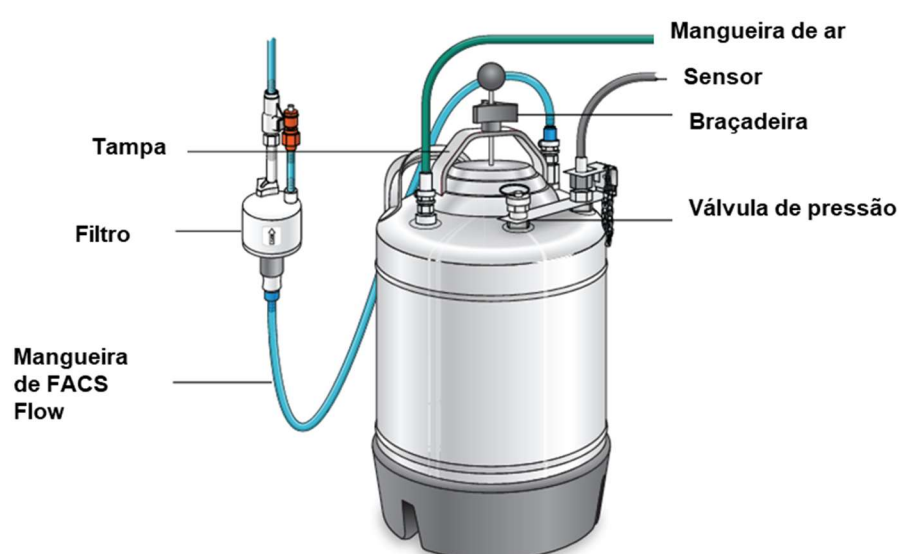
- Plugar as mangueiras no local correto.
- A direção do filtro 0,22 μ M deve estar correta. Neste caso, a seta do filtro deve estar para cima (mangueira laranja para cima) (Figura 2).
- Antes de abrir o tanque, sempre desconectar a mangueira de ar e despressurizar através da válvula de pressão.
- Ao manusear o tanque de *FACS Flow*, tomar extremo cuidado com o sensor (cabo preto) para não molhar ou danificar.
- Ao encaixar a tampa do tanque, para obter uma boa vedação, sempre posicionar a tampa verificando o encontro das marcações indicativas na tampa e no tanque.
- Ao final do uso do equipamento, retirar a pressão do tanque através da válvula de pressão para evitar desgaste da borracha.

O tanque *Waste* é onde fica alocado o resíduo gerado pelo equipamento. Este recipiente deve sempre conter hipoclorito hospitalar na concentração final de 0,5% (Volume total do tanque é de 10L). Para esvaziar o tanque, desconectar sempre os cabos antes de abrir a tampa para, então, despejar o líquido (Figura 3).

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO	
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007	
	REVISÃO: 1	
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1	

Nota: Na parte interna da tampa do *Waste* existe um filtro que não pode ser molhado (Figura 3). Caso o filtro molhe será necessária a troca da tampa. Solicite ao responsável técnico uma nova.

ATENÇÃO: Toda vez que seja necessário mexer nos tanques FACS Flow ou *Waste* com o citômetro ligado, o citômetro deve estar em STANDBY.



Mangueira	Correspondente
Azul	<i>FACS Flow</i>
Verde	Ar
Cabo preto	Sensor do nível da solução dentro do tanque
Válvula de pressão	Despressurização

Figura 2 – Componentes do Tanque de Salina.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO	
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007	
	REVISÃO: 1	
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1	



Figura 3 – Waste

O painel de controle do FACSCelesta™ é composto por (Figura 4):

- a. Indicadores de sistema (1):
System Status – mostra o status do tanque de salina e do waste. Verde quando tudo está OK; Âmbar quando o nível de *FACS Flow* no tanque está baixo ou waste está quase cheio. Vermelho quando o tanque está vazio ou o waste cheio.
Activity - Mostra se o citômetro está ligado e o status da aquisição.
- b. Botões de controle do fluido (2): Permitem iniciar ou parar a aquisição (RUN e STANDBY, respectivamente) e realizar o PRIME ou purga.
- c. Botões de fluxo de amostra (3): LOW - 12 µL/min, MEDIUM - 35 µL/min e HIGH - 60 µL/min.
- d. Botões de ajuste fino (4): Permitem o ajuste de fluxo para níveis intermediários. ATENÇÃO: Para o CS&T, o ajuste fino sempre deve estar em 250.
- e. Tela (5): Indicativo do ajuste fino e nível do tanque de *FACS Flow* e do Waste.
- f. Botão MODE (6): Permite silenciar alarme de nível crítico do Waste ou do *FACS Flow* no tanque. É usado também para entrar no modo HTS (segurar por 3s).

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007
	REVISÃO: 1
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1

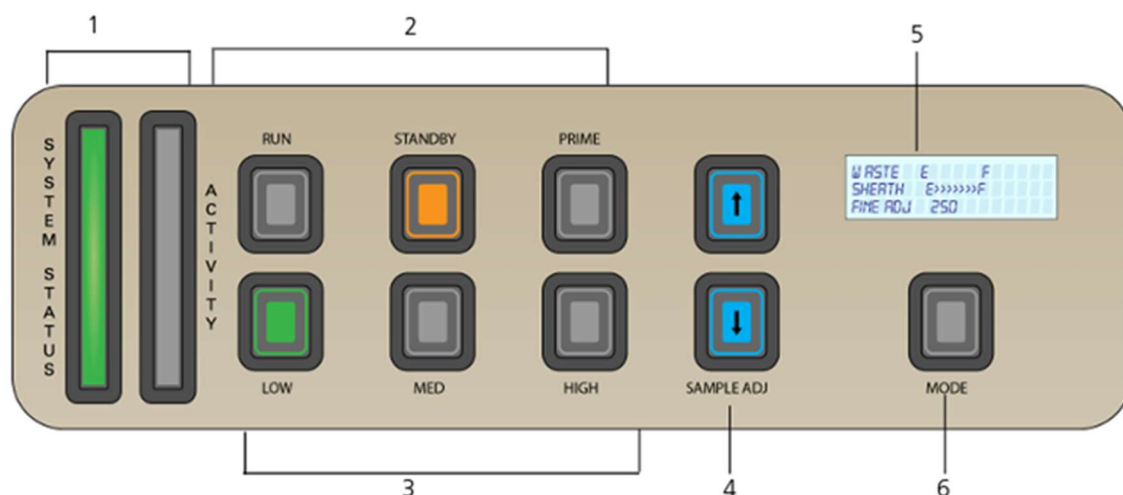


Figura 4 – Painel de controle

6.4 - Ligando o equipamento

6.4.1 Verificar o nível dos tanques de *FACS Flow* e *waste*. O tanque de *FACS Flow* deve conter quantidade suficiente para todo o procedimento. O *waste* deve ser preenchido com hipoclorito hospitalar para que a concentração final seja 0,5% (Obs.: o volume total do tanque é de 10 L).

6.4.2 Ligar o computador, teclado e mouse.

6.4.3 Ligar o citômetro no botão verde. Aguardar 30 min para o aquecimento do laser.

6.4.4 Abrir o software FACSDiva™. Obs.: Cada operador treinado terá usuário/senha pessoais e intransferíveis.

6.4.5 Na janela principal do software (quadrante inferior direito), verificar se o citômetro está conectado: o *System Status* deve estar verde.

Nota: O sistema deve estar pressurizado. Para certificar aperte no botão RUN, caso o mesmo esteja verde, o sistema pressurizou. Caso a cor esteja âmbar, o sistema não está pressurizado, aguarde mais um pouco ou verifique o encaixe da tampa do tanque de *FACS Flow*. Verificar também se o tubo conectado na *probe* de amostra não está trincado.

Nota: Caso seja necessário retire bolhas que possam entrar no sistema, realize a retirada de *FACS Flow* através da mangueira laranja do filtro (Figura 2) ou da mangueira superior ligada ao cabo azul (Figura 5). Reserve a salina drenada em um tubo para uso posterior.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007
	REVISÃO: 1
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1

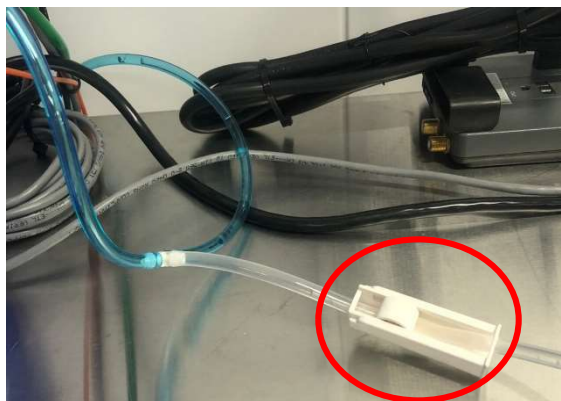


Figura 5 – Mangueira para retirada de bolhas.

6.5 - Limpeza e CS&T

Nota: As *beads* devem estar a temperatura ambiente pelo menos 20-30 minutos antes do uso.

6.5.1 Colocar o detergente na *probe* de amostra. Clicar em RUN e HIGH e deixar passando por 10 min.

Nota: O detergente é preparado com 3mL de detergente em 197 mL de água ultrapura e armazenado em tubos Falcon.

6.5.2 Colocar o tubo contendo água ultrapura. Clicar em RUN e HIGH por 10 min.

6.5.3 Realizar homogeneização manual do frasco de CS&T antes do preparo. Para o CS&T diário, é necessário preparar diluição, em tubo próprio de amostra, de 1 gota de CS&T em 350 µL de FACS Flow filtrado. Homogeneizar de forma branda em vórtex.

Nota: O CS&T diluído, após uso, pode ser guardado a 4 °C por até 48h, quando devidamente identificado e protegido da luz.

6.5.4 No software, clicar em Configuration → Cytometer → CST → Abre uma nova janela → *Setup control* → *Check performance* → Escolher o lote de CS&T que será lido.

6.5.5 Colocar o tubo contendo CS&T diluído na *probe* de amostra e clicar em RUN no software e no equipamento. A aquisição deve sempre ocorrer em LOW.

6.5.6 Após o fim da aquisição, analisar o Report. Caso o citômetro não passe no CS&T, realizar o procedimento novamente com uma nova diluição de CS&T ou entrar em contato com o suporte científico.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007
	REVISÃO: 1
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1

Nota: A análise do *Report* deve focar principalmente nos valores de “*Bright Bead % Robust CV*” e “ Δ PMTV”. O “*Bright Bead % Robust CV*” deve ser sempre abaixo do valor 6, especialmente na primeira leitura de cada laser. O “ Δ PMTV” deve estar entre + 50 e – 50.

6.5.7 Após análise do *Report*, colocar um tubo de água para limpeza da *probe* de amostra por 5 min.

6.6 – Montando a tela de trabalho e experimento

Nota: A estratégia de *gates* e ajustes de experimento não serão discutidos neste documento. Procure um profissional que possa auxiliar no delineamento experimental.

6.6.1 Criar uma pasta.

6.6.2 Criar um experimento.

6.6.3 Criar um tubo.

6.6.4 Aplicar o *Cytometer Settings* no Experimento e ajustar os *Settings* do specimen.

Nota: Não altere os parâmetros das abas *Laser* → *Cytometer*, aba *Delay* e *Window extension*.

6.6.5 Desenhar o seu *Worksheet*.

Nota: Para ativar os *gates*, clicar com o botão direito → *Show populations*.

Nota: O *storage gate* refere-se aos dados que serão salvos, referenciar o *gate* correto.

6.6.6 Ao finalizar a estratégia de *gates*, colocar a amostra → Clicar em RUN e na velocidade de aquisição desejada → Clicar em *Acquire*, esperar 30s → Clicar em *Recording*.

Nota: Não alterar a velocidade de aquisição (LOW, MEDIUM ou HIGH) durante a aquisição de seu experimento. Se necessário, pare a aquisição e comece uma nova com a velocidade de interesse.

6.6.7 Para compensação (deve ser feita antes do início do experimento): *Experiment* → *Compensation Setup* → *Create Compensation controls*.

6.6.8 Após adquirir os controles de compensação: *Experiment* → *Compensation Setup* → *Calculate compensation*.

	INSTRUÇÃO DE TRABALHO
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007
	REVISÃO: 1
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1

Nota: Caso seja necessário, realizar 3 primes para retirada de bolhas.

6.7 - Limpeza final e desligamento

6.7.1 Ao final do experimento, prepare um tubo contendo *FACS Clean*, um tubo contendo detergente e um tubo contendo água.

6.7.2 Coloque o tubo com *FACS Clean* na *probe* de amostra e aperte RUN e HIGH. Deixar adquirindo por 1 minuto com o braço aberto e 5 min com braço fechado.

6.7.3 Troque o tubo pelo de detergente. Pressionar RUN e HIGH, deixar adquirindo por 1 minuto com o braço aberto e 5 min com braço fechado.

6.7.4 Troque o tubo pelo de água. Pressionar RUN e HIGH, deixar adquirindo por 1 minuto com o braço aberto e 5 min com braço fechado.

Nota: Como regra, adquirir esses 5 min de água, nomeando um *specimen* como LIMPEZA e o tubo como H₂O, como prova da realização da limpeza pós corrida.

Nota: O equipamento só é considerado limpo quando a aquisição de água indicar menos de 20 eventos/s. Caso esse número não seja alcançado, repetir os passos de limpeza, até limpeza completa.

6.7.5 Deixar um tubo com 3 mL de água ultrapura na *probe* de amostra.

Nota: A *probe* de amostra deve estar sempre imersa em H₂O. Verificar o nível de H₂O no tubo periodicamente, quando o equipamento estiver desligado.

6.7.6 Após finalizada a limpeza, no modo STANDBY, preencher o tanque de *FACS Flow* e descartar o *waste*. Repor o hipoclorito hospitalar no *waste*.

6.7.7 Fechar o *software*, desligar o computador e o citômetro.

6.7.8 Retirar a pressão do tanque de *FACS Flow*.

Nota: Caso o citômetro ainda vá ser utilizado no mesmo dia, não desligar o equipamento. Informe-se com o técnico sobre a agenda de uso do equipamento.

Nota: Em caso de problema técnico, entrar em contato com o técnico responsável / tecnologista.

 Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Ceará	INSTRUÇÃO DE TRABALHO	
TÍTULO: Operação do Citometro de Fluxo BD FACSCelesta	CÓDIGO: IT.FIOCRUZCE.409.0007	
	REVISÃO: 1	
	CLASSIFICACAO SIGDA: 013.1	

7. REFERÊNCIAS

BD FACSCelesta™ Cell Analyzer User's Guide.

8. HISTÓRICO DE ALTERAÇÕES

Emissão inicial.

9. ANEXOS

Não aplicável.
