

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVeRSE	Versão: 1.1 (08/2025)

1. DESCRIÇÃO

O citômetro de fluxo analisa partículas ou células suspensas em líquido, onde anticorpos específicos com marcadores fluorescentes são utilizados para identificação de proteínas. As partículas entram em fluxo laminar e os marcadores são interrogados por um laser, a fluorescência produzida é capturada resultando nos dados para análise.

Modelo: FACSVeRse

Especificações:

Laser: Azul (488 nm)

Consumo de salina:

- Normal: 13,6 mL/min
- Alta sensibilidade: 6,6 mL/min

Tanque de salina e descarte: 5 L

Consumo de amostra (fluxo):

- Low: 12 µL/min
- Medium: 60 µL/min
- High: 120 µL/min
- Alta sensibilidade: 40 – 55 µL/m

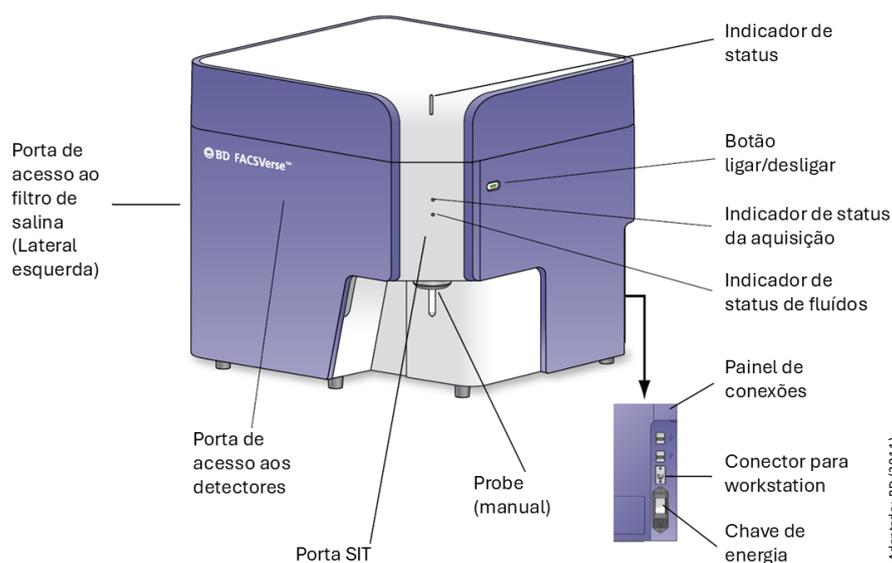


Figura 1 – Componentes gerais

Tabela 1 – Indicadores de *status* do sistema

Indicador	Condição	Status
Indicador de status	Verde	Pronto para trabalho
	Âmbar fixo	Falha
	Âmbar piscando	Aquecimento
	Vermelho	Sistema inoperante
Botão de ligar	Âmbar	Energia desligada
	Verde fixo	Energia ligada
	Verde piscando	<i>Shutdown</i> iniciado
Status da aquisição	OFF	Não adquirindo amostra
	Azul piscando	Adquirindo amostra
	OFF	Pronto para trabalho
Status de fluidos	Âmbar piscando	- Nível de salina baixo - Descarte quase cheio
	Vermelho	- Sem salina - Descarte cheio - Descarte desconectado

Tabela 2 – Indicadores de *status* da probe

Indicador	Condição	Status
Indicador de status LED na probe	Verde	Pronto para aceitar tubo
	Âmbar piscando	SIT (<i>sample injection tube</i>) <i>Flush</i> em andamento, não adicionar tubo
	OFF	Tubo na probe

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

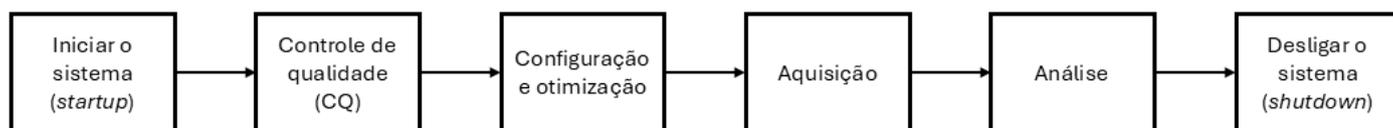
 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVSE	Versão: 1.1 (08/2025)

2. OPERAÇÃO

2.1 MATERIAL NECESSÁRIO

- PBS 1X Filtrado (1L para cada 30 amostras, Anexo III);
- Tubo para citômetro c/3 mL de água Milli-Q;
- Tubo para citômetro c/3 mL de hipoclorito de sódio 1%;
- Tubo Eppendorf c/500 µL PBS 1X Filtrado para CQ;
- Tubos Eppendorf 1,5 ou 2,0 mL com amostra (volume máximo 500 µL)

2.2 FLUXO OPERACIONAL



Adaptado: BD (2011)

Figura 2 – Fluxo operacional do citômetro de fluxo

2.3 INICIANDO O SISTEMA (STARTUP)

- Verificar o nível dos tanques:
 - Preencher o tanque de salina;
 - Esvaziar o tanque de descarte, se necessário;
- Conectar o estabilizador à rede elétrica e ligar;
- Ligar a chave de energia no canto inferior da lateral direita do equipamento;
- Ligar o equipamento pressionando o botão liga/desliga (luz verde = ligado);
- Aguardar 20 minutos para o aquecimento do laser (indicador de status piscando com a cor âmbar);
- Ligar o computador (utilizar a senha anotada no local);
- Abrir o programa BD FACSuite (não alterar o *username*, utilizar a senha anotada no local);
- Verificar o status de conexão e do sistema de fluídos na interface do programa (*Conected* = ícone verde, *Fluidics* = ícone verde).

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVVERSE	Versão: 1.1 (08/2025)

2.4 CONTROLE DE QUALIDADE DIÁRIO (PERFORMANCE CQ)

Avalia o desempenho do citômetro, ajustando os detectores e medindo a variação diária em comparação com *Characterization QC* (CQC) determinado previamente. Deve ser realizado diariamente antes do uso com as amostras.

- Prepare as beads CS&T:
 - Prepare um tubo Eppendorf com 500 µL PBS 1X Filtrado;
 - Adicione 2 gotas de beads CS&T (**ATUAL:** Geladeira 1, prateleira 8, Nº 11, lote: 71259);
 - Identificar e anotar data, pode ser mantido por 7 dias em geladeira (protegido com papel alumínio).
- Selecione Setup & QC na barra de navegação;
- Conferir se o campo *Task* contém “Performance QC”;
- Conferir se o lote das beads está correto;
- Homogeneizar o tubo e posicionar na probe para aquisição (usando o adaptador);
- Retirar o tubo de beads e posicionar o tubo contendo água Milli-Q;
- Clicar em “Yes” para visualizar os laudos (são gerados 2: **Normal** e **High sensitivity**);
- Clicar em “QC Tracking” para visualizar os gráficos dos parâmetros avaliados.

2.5 CONFIGURAÇÃO E OTIMIZAÇÃO

2.5.1 Criando ou abrindo um experimento

- Na barra de navegação, clique em “*Experiments*” (ícone de Erlenmeyer);
- A aba “*Manage Experiments*” será aberta, selecione a sua pasta de usuário ou crie uma nova, se necessário;
- Um novo experimento é aberto no *workspace*, o nome do experimento pode ser alterado na aba “*Manage Experiments*” clicando com o botão direito do mouse sobre o experimento.
- Um experimento com as configurações padrões é criado contendo um tubo (Tube_001) com as configurações padrões de tubo e um gráfico padrão é exibido na *worksheet*.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



POP N. 012

Elaboração: 04/2025

CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVERSE

Versão: 1.1 (08/2025)



Figura 3 – Visão geral do ambiente de trabalho do FACSuite

2.5.2 Painel de “Acquisition Status”

- Mostra os status da aquisição em tempo real e permite configurar “Flow rate”, “Events to display” e “SIT flush”;
- **Flow rate:** configura o fluxo da amostra no equipamento:
 - **Low:** quando é necessária uma maior precisão (ex.: experimentos com DNA) para detectar variações discretas na fluorescência;
 - **Medium e High:** para experimentos de imunofenotipagem ou para aumentar o rendimento de eventos;
 - **Normal ou High-sensitivity:** *high sensitivity* reduz o fluxo de salina e amostra, sendo utilizada para obter melhor separação entre populações de fluorescência negativa e positiva.
- **Events to display:** seleciona o número máximo de eventos exibidos nos gráficos;
- **SIT Flush:** seleciona o número de lavagens realizadas entre as aquisições, aumentar o número se estiver ocorrendo problemas de *carryover* entre as amostras.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVVERSE	Versão: 1.1 (08/2025)

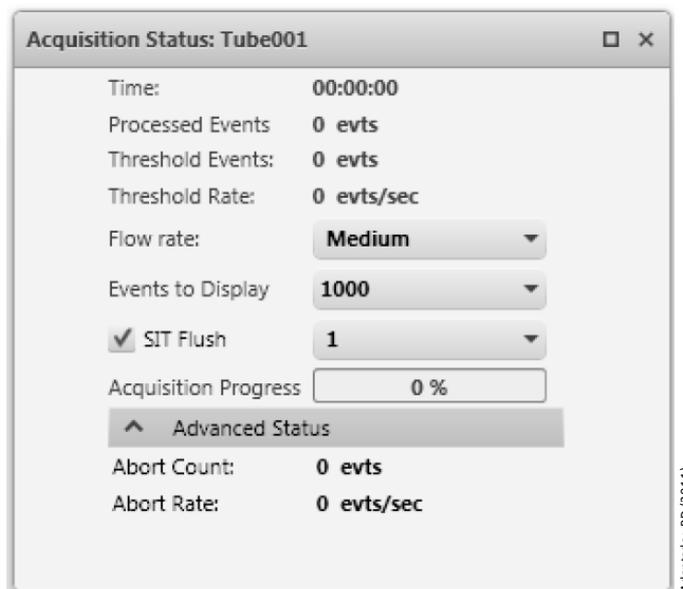


Figura 4 – Painel *Acquisition Status*

2.5.3 Painel de “Data Sources”

Este painel é usado para adicionar ou deletar tubos e arquivos FCS além de controlar a aquisição de dados. Usando o botão direito do mouse sobre o tubo, é possível fazer diversas configurações dos tubos. A seta do indicador de corrida (pointer) identifica qual tubo está sendo pré-visualizado ou adquirido e também qual está sendo exibido nos gráficos. Principais funções:

- **New tube:** adiciona um novo tubo na lista, usando as configurações do experimento;
- **Preview:** inicia o fluxo de amostra e a população dos gráficos com os dados, mas não grava dados de eventos;
- **Acquire:** inicia o fluxo de amostra e a gravação de dados em um arquivo FCS;
- **Stop:** interrompe o fluxo e aquisição de dados;
- **Next:** move o indicador de corrida para o próximo tubo da lista ou adiciona um novo tubo com as configurações do experimento se estiver no último da lista;
- **Pause:** pausa o fluxo de amostra e a contagem de eventos;
- **Resume:** reinicia o fluxo de amostra e a contagem de eventos;
- **Restart:** limpa os dados de preview ou de aquisição sem interromper o fluxo de amostra.

2.5.4 Painel “Cytometer”

Este painel exibe os status do sistema em tempo real e também exibe quando é necessário realizar protocolos de limpeza no sistema. Exibe também as configurações de voltagem, threshold e de laser.

- Em “*PMT Voltages*”, os fluorocromos que não estão em uso no experimento podem ser excluídos. A voltagem não precisa ser configurada por aqui, sendo otimizada pelo gráfico de pontos na *worksheet*.
- As configurações de laser não precisam ser alteradas, usualmente.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVERSE	Versão: 1.1 (08/2025)

2.5.5 Painel “Worksheets”

Este painel exibe a worksheet onde podem ser incluídos gráficos para análise dos dados do experimento. O gráfico padrão gerado inicialmente é um gráfico de pontos (*dotplot*) mas podem ser incluídos também histogramas, gráficos de contorno (*contour plot*) e de densidade (*density plot*). A barra de ferramentas da worksheet também inclui ícones para a adição de gates, estatísticas e outros. Para incluir novos gráficos:

- Clique no ícone do gráfico desejado;
- Clique e arraste o cursor no local desejado da worksheet, ajustando o tamanho do gráfico;
- Selecione o gráfico e clique com o botão direito no mouse no título do eixo X para selecionar o parâmetro desejado para o eixo X;
- Clique com o botão direito do mouse sobre o título do eixo Y para selecionar o parâmetro desejado para o eixo Y.
- **Opcional:** o ícone de grade, na barra de tarefas, exibe uma grade guia para ajudar no dimensionamento e posição dos gráficos.

2.5.6 Otimizando as Configurações do Citômetro para um Tubo

- Posicione um tubo (geralmente amostra branca) na probe e clique em preview;
- Ajuste as voltagens de PMT conforme a necessidade para que todas as populações estejam exibidas dentro da escala, para isso:
 - No gráfico, clique em PMTV no canto inferior direito;
 - Ajuste a voltagem para cada parâmetro com o controle de correr sobre o eixo;
 - Clique novamente em PMTV para desabilitar o controle de correr e evitar alterações acidentais.
- Selecione e ajuste um *threshold*, se necessário (pode ser útil para remover os eventos gerados por debris e partículas indesejadas).

2.5.7 Desenhando Gates no Gráfico

- Antes de criar os *gates*, o gráfico deve estar configurado e preenchido de dados (geralmente amostra branca);
- Para *gates* retangulares e elípticos:
 - Clicar no ícone correspondente na barra de tarefas;
 - Clicar e segurar o botão esquerdo do mouse no gráfico e arrastando até gerar uma forma com tamanho desejado;
 - Liberar o botão para concluir o *gate*.
- Para *gate* poligonal:
 - Clique no ícone na barra de tarefas;
 - Clique no gráfico para especificar uma posição inicial, um vértice é gerado;

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVERSE	Versão: 1.1 (08/2025)

- Clique em outra posição para adicionar outro vértice e repita o processo até formar o polígono da forma desejada;
- Clique sobre o vértice inicial ou dê um duplo-clique para encerrar o desenho do *gate*.
- Para *gate* com formato livre:
 - Clique no ícone na barra de tarefas;
 - Clique e segure o botão esquerdo do mouse para desenhar o formato desejado sobre o gráfico;
 - Solte o botão do mouse quando o formato estiver pronto.
- Após desenhados, os gates podem ser editados (tamanho, forma, rotação) e movidos no gráfico, conforme a necessidade.

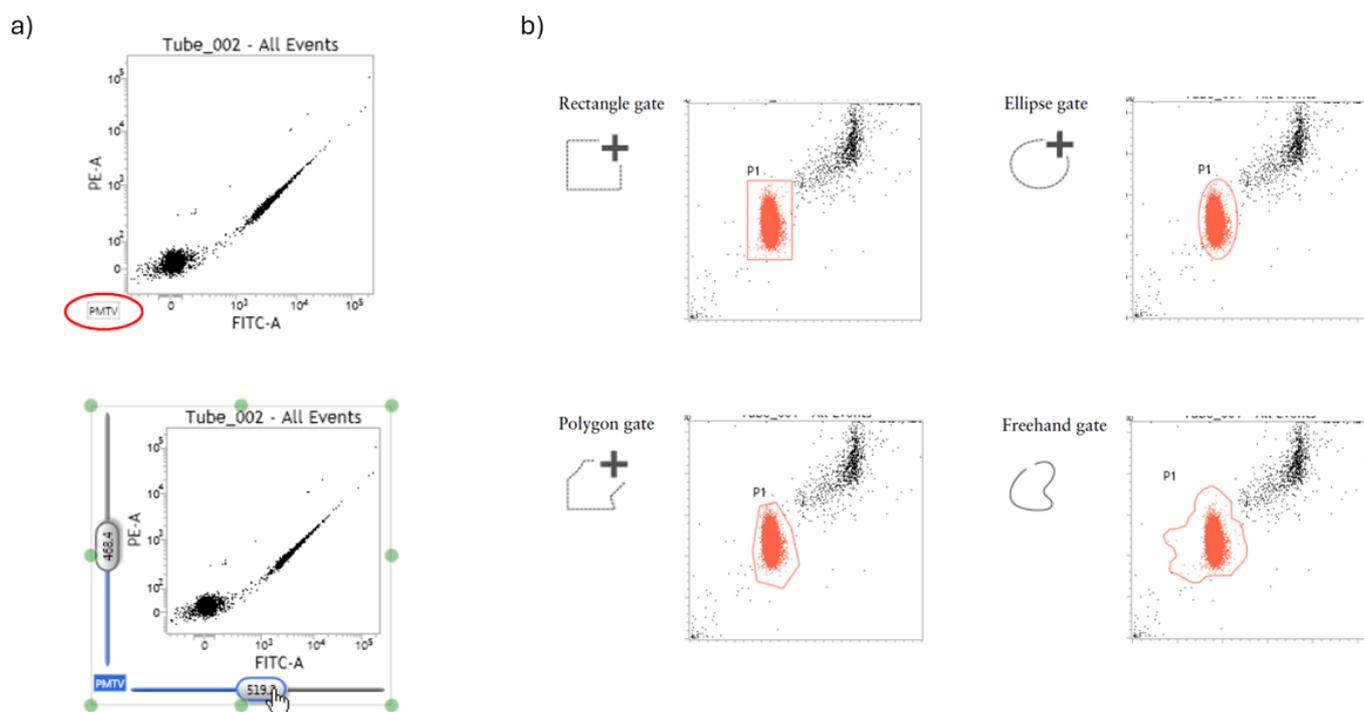


Figura 5 – Configuração da PMTV (a) e configuração de gates (b)

2.6 AQUISIÇÃO

- Ligue o aparelho e prepare o experimento (Itens 2.3 ao 2.5.1);
- Posicione um tubo com água Milli-Q na probe, em Flow, selecione High (2.5.2) e clique em Preview;
- Deixe a água correr por alguns minutos enquanto verifica a ocorrência de eventos no gráfico, se houver um número alto e eventos (>400) interrompa o Preview (clique em Stop), troque o tubo de água por um tubo com hipoclorito 1% e deixe correr por aproximadamente 2 minutos em Preview, com Flow em High e depois repita o processo com água Milli-Q;
- Para iniciar a análise das amostras, volte ao painel de experimento e verifique se o pointer está no primeiro tubo;

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVARSE	Versão: 1.1 (08/2025)

- Coloque uma amostra na probe e clique em Preview, se necessário, configure os gráficos, fluorocromos, voltagem e gates (Itens 2.5.4 e 2.5.7);
- Clique em Preview;
- Quando os pontos aparecerem no gráfico e estiverem adequados, clique em Acquire;
- Após o término da aquisição, remova o tubo da probe e aguarde o término do SIT Flush (LED da probe pisca em cor âmbar, quando troca para verde estará pronto para receber outro tubo);
- Clique em Next para o pointer passar para o próximo tubo da lista ou adicionar um tubo novo;
- Clique em Acquire para analisar a nova amostra;
- Ao final da aquisição de todos os tubos, remova o tubo de amostra e posicione um tubo com 3 mL de água Milli-Q na probe.

2.7 ANÁLISE

Não é permitida a realização de análise de dados diretamente na workstation do citômetro, os dados gerados podem ser acompanhados de maneira prévia durante a realização do experimento, porém, o tratamento mais detalhado dos dados deve ser realizado posteriormente.

Para exportar os dados do experimento:

- Insira um pendrive formatado (**obrigatoriamente**) em uma porta USB da workstation;
- Selecione todos os tubos do experimento (ou apenas os desejados);
- Clique em File > Export > FCS Files
- Navegue até o local desejado para salvar os arquivos;
- Clique em OK.

2.8 DESLIGANDO O SISTEMA (SHUTDOWN)

Para fazer a lavagem diária e o desligamento do citômetro:

- Na barra de menu, selecione **Cytometer > Fluidics>Clean Cuvette**, posicione um tubo com 3mL de água Milli-Q na probe e clique em **Continue**;
- Ainda com a água Milli-Q na probe, selecione **Cytometer > Fluidics>Drain and Fill Flow Cell** e clique em **Continue**;
- Remova o tubo da probe e selecione **Cytometer > Fluidics>SIT Flush** e clique em **Continue** (faça 2 vezes);
- Na barra de menu, selecione **Cytometer > Daily Clean**, uma nova janela irá abrir;
- Primeiro será solicitado o hipoclorito, coloque um tubo com 3 mL de hipoclorito 1% na probe, a a lavagem vai começar automaticamente, se necessário, clique em **Continue**;
- Depois será solicitada a água, posicione um tubo com 3 mL de água Milli-Q na probe e a lavagem vai começar automaticamente, se necessário, **Continue**;
- O procedimento de lavagem diária leva em torno de 4 minutos, ao terminar a janela vai fechar;

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVSE	Versão: 1.1 (08/2025)

- Na barra de menu, selecione **Cytometer > Shutdown**, o citômetro será desligado automaticamente;
- Em seguida, desligue a chave de energia no canto inferior da lateral direita do equipamento;
- Feche o programa FACSuite, desligue o computador e o estabilizador, deixe o estabilizador desconectado da tomada;
- Anote o uso do equipamento na folha de controle localizada junto ao mesmo (Anexo I).

3. MANUTENÇÃO

3.1 LIMPEZA DA PROBE (DAILY CLEAN)

Frequência: sempre após o uso do equipamento;

Material:

- Tubo para citômetro c/3 mL de água Milli-Q;
- Tubo para citômetro c/3 mL de hipoclorito de sódio 1%;

Procedimento:

- Consultar Item 2.8

3.2 LIMPEZA MENSAL (MONTHLY CLEAN)

Frequência: mensal;

Material:

- Tubo para citômetro c/3 mL de água Milli-Q;
- 2 L de solução hipoclorito 1%;
- Tubo para citômetro c/3 mL de hipoclorito de sódio 1%;
- 2 L PBS 1X filtrado.

Procedimento:

3.2.1 Bypass do filtro de salina

Deve ser feito antes da limpeza mensal para evitar danos ao filtro pelo hipoclorito.

- Abrir o painel na lateral esquerda do equipamento;
- Desconectar o dreno da parte de cima do filtro (Fig. 5. a);
- Pressionar os dois conectores de engate rápido (acima e abaixo) e remover o filtro;
- Instalar o bypass (localizado junto ao citômetro) pressionando os dois conectores de engate rápido (Fig. 5. b);
- Conectar o dreno na linha do bypass.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO



POP N. 012

Elaboração: 04/2025

CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVVERSE

Versão: 1.1 (08/2025)

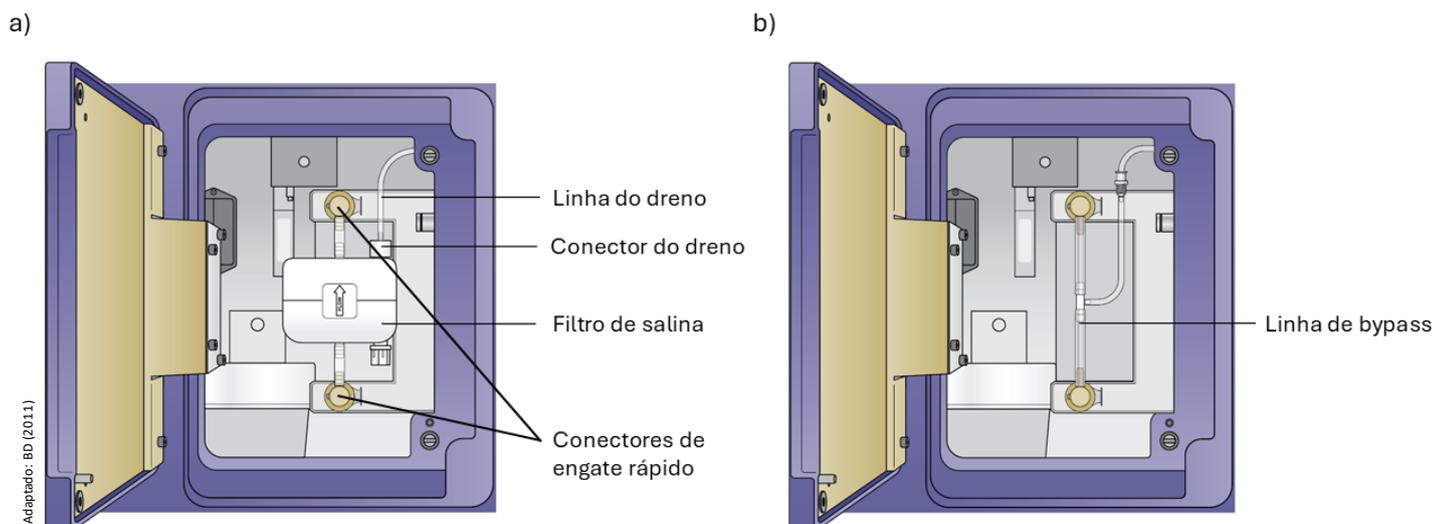


Figura 6 – Bypass do filtro de salina

3.2.2 Limpeza mensal

Após a instalação do bypass:

- Esvaziar o tanque de salina e adicionar, no mínimo, 2 L de hipoclorito 1%;
- Reinstalar o tanque e posicionar um tubo de com 3 mL de hipoclorito 1% na probe;
- Selecionar **Cytometer > Monthly Clean**;
- Após a lavagem com hipoclorito, lavar o tanque de salina e adicionar, no mínimo, 2 L de PBS 1X filtrado;
- Reinstalar o tanque e posicionar um tubo de com 3 mL de água Milli-Q na probe e clicar em **Continue**;
- Após o término, remover o bypass e reinstalar o filtro de salina, conectando novamente o dreno ao filtro;
- Selecionar **Cytometer > Fluidics > Purge Sheath Filter**.
- Repetir esta purga do filtro pelo menos 1 vez para remover possíveis bolhas presentes no filtro.
- Caso esteja apresentando problemas na leitura das beads durante o **PERFORMANCE CQ**: na barra de menu, selecione **Cytometer > Fluidics > Clean Cuvette**, posicione um tubo com 3 mL de detergente BD diluído (Anexo IV) na probe e clique em **Continue**. Espere 15 minutos, posicione um tubo com 3 mL de água Milli-Q na probe e repita o processo de **Clean Cuvette** 3 vezes usando água.
- Ainda com a água Milli-Q na probe, selecione **Cytometer > Fluidics > Drain and Fill Flow Cell** e clique em **Continue**;
- Remova o tubo da probe e selecione **Cytometer > Fluidics > SIT Flush** e clique em **Continue** (faça 2 vezes).

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVVERSE	Versão: 1.1 (08/2025)

3.3 OBSTRUÇÃO DA PROBE

- Posicione um tubo com 3 mL de hipoclorito 1%, em Flow, selecione High (2.5.2) e clique em Preview;
- Após alguns minutos clique em Stop;
- Posicione um tubo com 3 mL de FACSrinse, em Flow, selecione High (2.5.2) e clique em Preview;
- Após alguns minutos clique em Stop;
- Posicione um tubo com água Milli-Q na probe, em Flow, selecione High (2.5.2) e clique em Preview;
- Após alguns minutos clique em Stop;

REFERÊNCIAS

BD. **BD Biosciences Fluorochrome Reference Chart**. 2012.

BD. **BD FACSVerse Apostila do Operador**. 2011

BD. **BD FACSVerse Flow Cytometer Technical Specifications**. 23-13548-01, 2012.

BD. **BD FACSVerse Flow Cytometer Filter Guide**. 23-14700-01, 2014.

BD. **BD FACSVerse System User's Guide**. 23-11463-00 Rev. 01, 2011.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012 (ANEXO II)	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVVERSE	Versão: 1.1 (08/2025)

ANEXO II – Guia de Filtros e Quadro de Referência de Fluorocromos para o BD FACSVVERSE

Dyes	Application	Filters	Mirrors
------	-------------	---------	---------

1-laser, 4-color configuration

488 nm			
SSC	Cell surface markers, live/dead discrimination, cell cycle	488/15	NONE
FITC, BD Horizon Brilliant™ Blue 515, Alexa Fluor® 488	"	527/32	507 LP
PE, PI	"	586/42	560 LP
PerCP, PerCP-Cy™5.5, PE-Cy™5, 7-AAD	"	700/54	665 LP
PE-Cy™7	"	783/56	752 LP

Adaptado: BD (2014)

Instrument	Excitation Laser Line (nm)	Fluorescence Channel	Fluorochromes provided by BD Biosciences			
BD FACSVVERSE™*	488	Green	FITC	Alexa Fluor® 488		
		Yellow	PE	PI		
		Orange	BD Horizon™ PE-CF594 ^a	PE-Texas Red® ^a		
		Red	7-AAD	PE-Cy5	PerCP	PerCP-Cy5.5
		Infrared	PE-Cy7			
	640 ^a	Red	APC	Alexa Fluor® 647		
		Far Red	Alexa Fluor® 700 ^a			
		Infrared	BD APC-H7	APC-Cy7		
	405 ^a	Blue	Brilliant Violet™ 421	BD Horizon™ V450	VPD450	Pacific Blue™
		Green	BD Horizon™ V500	AmCyan		

Adaptado: BD (2014)

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

 	POP N. 012 (ANEXO III)	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVVERSE	Versão: 1.1 (08/2025)

ANEXO III – PREPARO DE PBS 1X PARA USO COM O CITÔMETRO

Em substituição ao BD FACS Flow Sheath Fluid (# 342003) utilizar PBS 1x comercial (filtrado e autoclavado) ou a solução de PBS 1x preparada no laboratório conforme a seguinte formulação:

- **Para cada litro de solução PBS 1X:**
 - 8,0 g NaCl
 - 0,2 g KCl
 - 1,44 g Na₂HPO₄
 - 0,24 g KH₂PO₄
- Adicionar **água ultrapura** até 1 litro e ajustar o pH para 7,2;
- Filtrar contra partículas superiores a **0,22 µm**;
- Autoclavar e manter em geladeira (2 a 8 °C).

Alternativamente, pode ser preparada uma solução de PBS 10X para posterior diluição 1:10 e uso:

- **Para cada litro de solução PBS 10X:**
 - 80,0 g NaCl
 - 2,0 g KCl
 - 14,4 g Na₂HPO₄
 - 2,4 g KH₂PO₄
- Adicionar **água ultrapura** até 1 litro e ajustar o pH para 7,2;
- Filtrar contra partículas superiores a **0,22 µm**;
- Autoclavar e manter em geladeira (2 a 8 °C).
- **Antes do uso, para cada litro de solução PBS 1X:**
 - Pipetar 100 mL de PBS 10X;
 - Completar o volume para 1L com água Milli-Q

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO		
 	POP N. 012 (ANEXO IV)	Elaboração: 04/2025
	CITÔMETRO DE FLUXO BD FACSVÉRSE	Versão: 1.1 (08/2025)

ANEXO IV – DILUIÇÃO DO DETERGENTE CONCENTRADO BD (Ref. 660585)

Para uso repetido do equipamento:

- Pipetar 3 mL de detergente BD (BD Detergent Solution Concentrate - Ref. 660585);
- Diluir em 197ml de água milli-Q;
- Quantidade suficiente para duas semanas de uso.

Para uso único

Para cada 1 mL de detergente diluído:

- Pipetar 15 μ L de detergente BD (BD Detergent Solution Concentrate - Ref. 660585);
- Diluir em 985 μ L de água milli-Q;

Para 4 mL total (caso equipamento não seja utilizado em breve ou em duas semanas):

- 60 μ L de detergente em 3940 μ L de água Milli-Q.