



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

FRANCIELLE RAMALHO ROCHA

**Desenvolvimento e validação de controle de qualidade interno
in house para quantificação de células progenitoras
hematopoéticas CD34+/CD45+.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre (a) em Pesquisa e Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

**Botucatu - SP
2020**

FRANCIELLE RAMALHO ROCHA

Desenvolvimento e validação de controle de qualidade
interno *in house* para quantificação de células
progenitoras hematopoéticas CD34+/CD45+

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestre (a) em Pesquisa e
Desenvolvimento: Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Márjorie de Assis Golim

Botucatu - SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Rocha, Francielle Ramalho.

Desenvolvimento e validação de controle de qualidade interno *in house* para quantificação de células progenitoras hematopoéticas CD34+/CD45+. / Francielle Ramalho Rocha. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Márjorie de Assis Golim

Capes: 90400003

1. Células-tronco hematopoéticas. 2. Citometria de fluxo.
3. Controle de qualidade.

Palavras-chave: Célula progenitora hematopoética; Citometria de fluxo; Controle de qualidade interno; Solução preservante.

DEDICATÓRIA

A DEUS,
e a base de tudo:
minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por me sustentarem até aqui, com saúde e força.

A minha família, mãe Edna, pai Antonio, minha irmã Flávia, meu irmão Rodrigo e todos os outros (cunhadas, sobrinha, tios e tias, primos e primas) que nunca me deixaram desistir e acreditaram em mim até mesmo quando eu não mais acreditava. Vocês são a base de tudo.

A um mais que amigo, Danilo Oliveira, que esteve junto nessa batalha cheia de altos e baixos que foi esse período. Você fez parte de tudo isso, obrigada por existir e estar comigo.

A minha pequena fonte de luz, que me fez com certeza ir mais longe nessa caminhada, que me faz querer a todo momento um mundo melhor, a quem me fez ser um pouco mãe mesmo sem ter filhos, minha afilhada Maria.

A minha orientadora Dr^a Marjorie de Assis Golim, um ser de luz inigualável, que me ajudou a tornar tudo isso possível, com muita dedicação e paciência. Chefe, obrigada por tudo, nunca me esquecerei de tudo que fez por mim, não só durante o mestrado, mas desde o meu aprimoramento profissional.

Aos amigos do laboratório, Aline Braz, Rodrigo Lima, Lia Mantovani, Mariana Puatto, Larissa Binelli, Luis Guilherme Chimeno, foi surpreendente poder contar com vocês em todos os momentos, são amigos que vão além da divisão de experiências e bancada, são amigos que levarei em meu coração por onde eu for vocês também são responsáveis pelo “Incrível” trabalho desenvolvido.

Aos amigos de trabalho, Thaisa Oliveira, Amanda Alves, Suraya Rocha, Juliana Ravelli e os demais, aliás, foi com vocês que eu chorei e surtei durante 12 horas nos meus plantões achando que não daria conta.

Aos amigos que estavam distantes, Luciana Queiroz, Erick Dela Val, Juliana Toledo, porém nunca deixaram de ser importantes e de me apoiarem, ainda bem que existe tecnologia para nos aproximar.

Aos pacientes que mesmo em um momento difícil de suas vidas aceitaram participar da pesquisa e quiseram, naquele momento, ajudar outras pessoas.

EPÍGRAFE

“No fim tudo dá certo, e se não deu certo
é porque ainda não chegou ao fim.”

Fernando Sabino

RESUMO

O sistema de qualidade é de suma importância em laboratórios clínicos para avaliação de processos analíticos de maneira que os resultados liberados sejam verdadeiros. Para a metodologia de imunofenotipagem celular por citometria de fluxo as amostras devem ser frescas e os exames realizados preferencialmente dentro de 48 horas. É relevante utilizar amostras de controle de qualidade internos (CQI) padronizadas, de modo que possam ser repetidas rotineiramente, como referencial de qualidade. No Brasil, poucos serviços comercializam amostras preservadas para uso como CQI. Deste modo, a padronização *in house* com validação de processo para obtenção de amostras que possam ser utilizadas para esta finalidade é relevante. O objetivo deste trabalho foi desenvolver controle de qualidade interno para as rotinas de quantificação de células progenitoras hematopoéticas (CPH), utilizando solução preservante e avaliar a reprodutibilidade e estabilidade ao longo do tempo. Foram preparadas diferentes soluções preservantes, sendo selecionada uma composição, originalmente padronizada neste estudo. Foram utilizados 5mL de sangue periférico, sendo este acrescido da solução a ser testada. Imediatamente, realizou-se a quantificação das populações de CPH em tubo Trucount®, usando anti-CD45, anti-CD34 e 7-AAD, conforme indicado pelo fabricante. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur®-BD, para obtenção dos valores absolutos das CPH no dia zero, 7, 21, 35 e 49. Durante este período, as amostras foram mantidas refrigeradas (2 a 8°C). Os valores obtidos no dia zero foram definidos como referencial e fixou-se o percentual de variação aceitável em $\pm 40\%$, o mesmo aceito nos CQIs comerciais. Ao avaliar o desempenho das amostras preservadas durante o período preconizado, observou-se eficiente preservação celular, com distribuição estável e boa reprodutibilidade, tendo as variações limitadas ao intervalo preconizado. O produto gerado trata-se de uma solução preservante/conservante exclusiva, utilizada como CQI, passível de registro ou patente, validada para uso em imunofenotipagem de CPHs para fins de transplante autólogo, com desempenho semelhante ao de um controle de qualidade comercialmente disponível.

Palavras-chaves: Controle de Qualidade Interno, célula progenitora hematopoética, citometria de fluxo, solução preservante.

ABSTRACT

The quality system is of paramount importance in clinical laboratories for evaluating analytical processes in order to consider true the released results. The samples must be performed fresh preferably within 48 hours for the cell immunophenotyping methodology by flow cytometry. It is relevant to use standardized internal quality control (IQC) samples, thus they could be repeated routinely, as a quality benchmark. In Brazil, only a few services commercialize preserved samples for use as IQC. Therefore, it is relevant to use in-house standardization with process validation to obtain samples that can be used for this purpose. The objective of this work was to develop an IQC for a daily routine quantification of hematopoietic stem cells (HSCs) by using a preservative solution and to evaluate the reproducibility and stability over time. Different preservative solutions were prepared, and a composition, originally standardized in this study, was selected. 5mL of peripheral blood were used, which was added to the solution to be tested. The HSCs populations were immediately quantified in a Trucount® tube, using anti-CD45, anti-CD34 and 7-AAD, as indicated by the manufacturer. The reading was performed in a flow cytometer model FACSCalibur®-BD in order to obtain the absolute values of HSCs on day zero, 7, 21, 35 and 49. During this period, the samples were kept refrigerated (2 to 8°C). The values obtained on day zero were defined as a reference and the percentage of acceptable variation was set at $\pm 40\%$, the same accepted in commercial IQCs. It was observed an efficient cell preservation when evaluating the performance of samples preserved during the recommended period. In addition, it was noted a stable distribution and significant reproducibility, with variations being limited to the recommended interval. The generated product is an exclusive preservative/preservative solution, which was used as an IQC. Moreover, this finding is subject to be registered or patented and validated for use in HSCs immunophenotyping for autologous transplantation purposes, with similar performance to the current commercially available quality control.

Keywords: Internal Quality Control, hematopoietic progenitor cell, flow cytometry, preservative solution.

SUMÁRIO

1- Introdução.....	10
1.1 Controle de Qualidade em Laboratórios Clínicos.....	10
1.2 Transplante Autólogo de Células Progenitoras Hematopoéticas.....	13
1.3 Citometria de Fluxo.....	14
2. Objetivos.....	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3. Material e Métodos.....	18
3.1 Sujeitos.....	18
3.2. Amostra de sangue periférico.....	18
3.3 Preparação da solução preservante.....	18
3.4 Preparo dos Controles de Qualidade Internos <i>in house</i>	19
3.5 Quantificação de CPHs por citometria de fluxo – Protocolo ISHAGE – Plataforma Única.....	19
3.6 Análise estatística.....	21
4. Resultados e Discussão.....	24
5. Conclusão.....	34
6. Referências.....	35
7. Apêndice.....	39
Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido.....	39

1-INTRODUÇÃO

Com evolução natural dos conceitos de qualidade surgiram preocupações com a Política da Qualidade. Na área laboratorial a primeira iniciativa interlaboratorial de Controle da Qualidade foi realizada nos EUA, em 1947, por Belk e Sunderman. Na década de 1960, ocorreu a evolução dos conceitos com a regulamentação nos Estados Unidos da América, com o objetivo de definir diretrizes e padrões, seguida de uma lei federal americana atualizada em 1988 (BELK; SUNDERMAN, 1947; MENDES; SUMITA, 2010).

Desde então, essa prática tem sido cada vez mais adotada, caracterizando o Século XX como sendo o Século da Qualidade. Todo laboratório deve assegurar que os resultados produzidos reflitam, de forma fidedigna e consistente, a situação clínica apresentada pelos pacientes e garantir que o resultado não sofra interferência durante o processo (CHAVES, 2010).

O setor de análises clínicas foi impulsionado devido ao aumento da demanda da realização de exames e a agilidade na liberação dos resultados, trazendo ao Brasil, em 1960, processos automatizados. Através dessa inovação houve a necessidade de novas formas de controle de qualidade com duas ferramentas importantes que têm sido aprimoradas ao longo dos anos, sendo essas: controle de qualidade interno e ensaio de proficiência (VIEIRA et al., 2011).

O controle de qualidade interno é definido pela organização mundial da saúde como um conjunto de procedimentos que avalia de maneira contínua os trabalhos e resultados obtidos por determinado laboratório. Apresenta como objetivo garantir a integridade do processo analítico, reduzindo a possibilidade de resultados alterados de forma errônea aos pacientes (KINNS et al., 2013).

1.1 Controle de Qualidade em Laboratórios Clínicos

Nos laboratórios clínicos, o controle de qualidade é de suma importância para a avaliação dos processos analíticos aos quais uma amostra é submetida, permitindo a detecção de possíveis desvios metodológicos e correção dos mesmos, assegurando a liberação de resultados genuínos. A garantia de qualidade de resultados de exames laboratoriais é fundamental visto que estes são ferramentas importantes para concretizar diagnósticos, interfaceando com achados clínicos que,

em conjunto, possibilitarão ao profissional da saúde um diagnóstico preciso. (BERLITZ, 2010; SANTOS, ZANUSSO JUNIOR, 2015).

Melhorias na qualidade também levam a redução de custos por evitar a repetição de exames, que resultam em desperdício de tempo e recursos financeiros (SANTOS e ZANUSSO JUNIOR, 2015).

No Brasil, um marco importante para adoção maciça de controle interno de qualidade em laboratórios clínicos foi a resolução da ANVISA RDC Nº. 302/05, que se tornou requisito básico para funcionamento de laboratórios.

De acordo com a RDC Nº. 302, o laboratório clínico deve assegurar a confiabilidade dos serviços laboratoriais prestados, por meio de controles interno e externo da qualidade (BRASIL, 2005).

Para obtenção de contínua melhoria, todos os procedimentos de execução do exame laboratorial, fase pré-analítica, analítica e pós-analítica, devem ser analisados de maneira crítica, abrangendo todos os aspectos, sendo eles administrativos, técnicos e organizacionais. O sistema de qualidade empregado em um laboratório necessita de organização e disciplina em todos os processos de execução do exame, desde a escolha do método apropriado, coleta adequada, execução, laudo e interpretação, possibilitando que os indicadores laboratoriais avaliem a eficiência destes procedimentos, pois uma modificação nos processos executados, por menor que seja, pode influenciar o resultado final do exame, diminuindo de modo importante a qualidade empregada no serviço (BASQUES, 2013; SANTOS, ZANUSSO JUNIOR. 2015; VIEIRA et al., 2011).

Os resultados obtidos através do controle de qualidade devem encontrar-se dentro dos limites estabelecidos pelos indicadores laboratoriais pré-determinados, o qual apresenta, de forma qualitativa ou quantitativa, erros e falhas durante a fase analítica. Sua finalidade é auxiliar na detecção de erros que necessitem de ações corretivas (PLEBANI, 2009; ORIGA, OTTOBONI, 2013; RICÓS, GARCIA-VICTORIA, DE LE FUENTE, 2004).

Amostras de controles internos mimetizam o exame que será avaliado, sendo este preparado da mesma forma que a rotina laboratorial. A amostra controle apresenta valor conhecido, com o intuito de verificar a reprodutibilidade e estabilidade do sistema analítico. Esta verificação é realizada através de análises estatísticas, avaliando geralmente média, desvio-padrão e coeficiente de variação (VIEIRA et al, 2011).

A amostra controle deve se apresentar significativamente estável, ou seja, deve apresentar pouca variação de resultados. O laboratório pode produzir sua própria amostra controle, desde que mantenha a característica de estabilidade. Também é possível adquirir amostras comercialmente disponíveis, de serviços especializados (BASQUES, 2013).

Para assegurar a qualidade é necessário que todas as etapas do processo sejam avaliadas, incluindo a metodologia, processamento, equipamentos, entre outros. As características de exatidão, precisão, sensibilidade, especificidade, devem ser mensuradas para verificar a possibilidade de interferentes como: estabilidade de reagentes, erros de procedimentos, falhas em equipamentos. Avaliando estas características através de análises de gráficos de Levey-Jennings e regras de Westgard, torna-se possível identificar erros aleatórios, referente a imprecisão, e erros sistemáticos, caracterizados pela inexatidão, desta forma sendo possível implementar ações corretivas para minimizar ou eliminar os erros (FONSECA, 2004; MENDES, SUMITA, 2010; MENDES, SUMITA, 2016).

Na demonstração do sistema analítico de uma rotina o gráfico de Levey-Jennings é amplamente adotado, nele as informações da corrida em função do tempo são plotadas. O gráfico é composto por uma linha central de média e linhas adjacentes correspondendo ao desvio-padrão (DP), duas acima e duas abaixo da média. A análise do gráfico de Levey-Jennings colabora na detecção de possíveis erros que possam ocorrer, tornando-se ferramenta importante para a garantia da confiabilidade e veracidade dos resultados obtidos. Juntamente ao gráfico, regras múltiplas de Westgard podem ser aplicadas para identificação de possíveis erros que culminem em quebra de regras, sendo cada uma delas de finalidade bem caracterizada (BERLITZ, 2010).

As Regras Múltiplas de Westgard são utilizadas para interpretar resultados no sistema de Controle de Qualidade Interno (CQI), para tanto, utiliza-se uma combinação de critérios de decisão, com objetivo de identificar comportamentos inadequados em uma ou mais corridas analíticas. Em geral, a forma mais empregada na descrição das regras e descrita por Westgard se dá por meio da indicação do número de vezes que uma situação ocorre e pelo limite no gráfico de controle. Quanto maior o “n” amostral trabalhado, maiores as chances de identificação precoce de erro. Desta forma, as regras auxiliam na compreensão das não conformidades, assim como, no esclarecimento das informações sobre o tipo de

erro apresentado, podendo ser sistemático ou aleatório, possibilitando, então, a revelação da causa inicial do problema, a fim de se eliminar os erros (WESTGARD, 2002).

1.2 Transplante Autólogo de Células Progenitoras Hematopoéticas

A célula progenitora hematopoética (CPH) é definida pela capacidade de autorenovação, diferenciação e multiplicação, possibilitando sua maturação em células progenitoras de todas as linhagens sanguíneas, levando a reconstituição da população hematopoética a partir de uma única célula. Naturalmente, estão disponíveis em baixa quantidade no sangue periférico, porém em quantidade suficiente para autorrenovação. Estas células normalmente são obtidas do sangue periférico, cordão umbilical e medula óssea (JANSEN et al., 2005; SANTIS, 2013; SENEGAGLIA et al., 2009; VERFAILLIE, 2002).

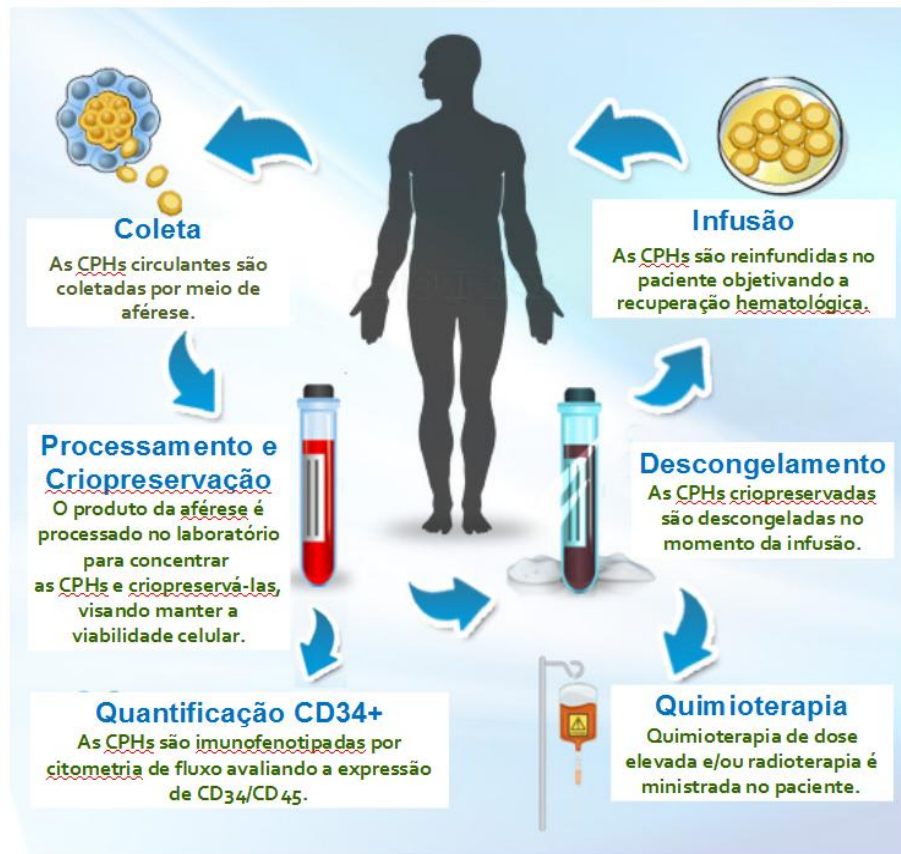
As CPHs são de grande importância para os transplantes de medula óssea, autólogos e alogênicos, procedimentos estes realizados para o tratamento de pacientes com doenças hematológicas. Para que as terapias realizadas tenham resultados satisfatórios, se faz necessária a expansão do número das CPHs, mediante administração de fatores de crescimento hematopoiético, como o G-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos) e o GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos) (DELAMAIN, 2004; GAMBELL et al., 2012; COMBARIZA et al., 2016; DUARTE et al., 2016; SENEGAGLIA et al., 2009).

A coleta pode ser feita via sangue periférico, após mobilização das CPHs da medula para a periferia. Faz-se então coleta por meio de aférese, sendo as CPHs criopreservadas (DUARTE et al., 2016; MARQUES et al., 2017).

As CPHs apresentam fenótipo com expressão dos antígenos CD34+/CD45+, sendo altamente expresso em células pluripotentes, ao passo que durante a maturação celular ocorre gradativa redução da expressão antigênica de CD34, sendo o nível de maturação celular inversamente proporcional a expressão deste marcador (CARVALHO et al., 2009).

No decorrer dos anos, vários aspectos e facilidades como, melhor capacidade de mobilização, facilidade na coleta, redução na internação hospitalar, agilidade no enxerto, fizeram com que o uso das células progenitoras hematopoéticas aumentasse (ROCK et al., 2000).

FIGURA 1: Representação esquemática de coleta de células progenitoras hematopoéticas para transplante autólogo.



1.3 Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo é capaz de realizar caracterizações físico-químicas das células, através de metodologia multiparamétrica que permite a determinação celular pela avaliação de tamanho, granulosidade e expressão de moléculas avaliadas por marcadores fluorescentes, sendo a identificação realizada célula a célula. A citometria de fluxo é o método adotado para quantificação das CPHs pós-mobilização tanto no sangue periférico quanto no produto coletado por aférese. Através do fenótipo expresso por estas células, faz-se a caracterização qualitativa e quantitativa, gerando valores absolutos e relativos. (SALES, VASCONCELOS, DUARTES, 2013).

Exames de imunofenotipagem por citometria de fluxo, especialmente aqueles nos quais a contagem celular absoluta é necessária, devem ser realizados com amostras frescas, preferencialmente em 48 horas após coleta. Deste modo, amostras de controles de qualidade internos (CQI) que possam ser padronizadas e repetidas em várias rotinas, como referencial de qualidade, se fazem necessárias (PLEBANI et al., 2006).

Há poucos serviços especializados no Brasil que comercializam estas amostras e a padronização *in house* exige validação de soluções preservantes que permitam manter a estabilidade e reprodutibilidade ao longo do tempo de preservação amostral, visto que a degradação celular pode comprometer diretamente a expressão fenotípica.

A quantificação de células CD34 é de grande relevância no transplante de CPHs, visto que se caracteriza como preditor do momento ideal da coleta destas células. É um método rápido, capaz de identificar e quantificar as populações de CD34+/CD45+, sendo o protocolo ISHAGE (*International Society for Hematotherapy and Graft Engineering*) o padrão internacional adotado para esta finalidade. Este protocolo é baseado em plataforma única, ou seja, realizado exclusivamente em único equipamento (no caso, citometro de fluxo), no qual se utilizam microesferas denominadas *beads* que permitem a contagem absoluta, além de associar um corante de viabilidade (7-AAD), garantindo o resultado de quantificação de células CD34+/CD45+ viáveis por microlitro de sangue ou produto da aférese (MASSIN et al., 2015).

É preconizado na literatura que o número adequado de CPHs no sangue periférico deve ser de 10 a 20 células CD34+/CD45+ viáveis por microlitro, definindo assim, o momento de realizar a aférese para obtenção das CPHs (LEMOS et al., 2018; TING YU et al., 2016).

A coleta é realizada após a estimulação da medula com drogas mobilizadoras e confirmação de número suficiente de CPHs no sangue periférico. O valor alvo da coleta deve ser igual ou maior a $2,5 \times 10^6$ células CD34⁺ por kg de peso do paciente. Essa é a quantidade mínima para a enxertia hematológica. Quanto maior o número de células mais rápido e eficiente será a pega da medula, aumentando a possibilidade de sucesso (GAMBELL et al., 2012; MENDRONE JUNIOR, 2009)

Em 2016, foi implantado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu o serviço de Transplante de Medula Óssea Autólogo. Adotamos como valores-alvos 20 células CD34+/CD45+ viáveis/uL de sangue periférico e $2,5 \times 10^6$ células CD34⁺ por kg de peso do paciente.

O Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu – HCFMB está inserido no contexto do Transplante de Medula Óssea Autólogo, sendo responsável pela quantificação das CPHs nas etapas preconizadas do processo.

Este participa de programa de avaliação externa e interna da qualidade, processando amostras desconhecidas, padronizadas e enviadas por serviço especializado. O programa de controle de qualidade apresenta como finalidade garantir que resultados obtidos sejam consistentes e reprodutíveis. A implantação de sistemas de qualidade é fundamental, sejam estes sistemas próprios do serviço, ou serviço externos contratados.

Devido à escassez de empresas responsáveis pela produção de controles de qualidade para a quantificação de células progenitoras hematopoéticas CD34+/CD45+, juntamente com o alto custo destas amostras controles (sangue humano com estabilizantes e conservantes) e, visando a importância de controles internos de qualidade, objetivou-se neste trabalho a validação de controle de qualidade interno, desenvolvidos no próprio serviço (*in house*), com menores custos, capaz de manter a reprodutibilidade e resultados consistentes, garantindo a qualidade da quantificação de CPHs CD34+/CD45+.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver Controle de Qualidade Interno para quantificação de células progenitoras hematopoéticas utilizando diferentes soluções preservantes, e avaliar a reprodutibilidade em imunofenotipagens de células CD34+/CD45+ realizadas por citometria de fluxo.

2.2 Objetivos Específicos

1. Padronizar diferentes concentrações de soluções preservantes, testando combinações de compostos químicos;
2. Avaliar a estabilidade e a reprodutibilidade das imunofenotipagens após conservação, numa cinética temporal;
3. Realizar análises estatísticas para avaliar o desempenho e validação do controle interno desenvolvido comparando-se ao controle interno comercial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sujeitos

Este foi um estudo prospectivo, no qual foram incluídas 8 amostras de pacientes que apresentavam doenças hematológicas, principalmente linfomas e mieloma múltiplo, com indicação de transplante autólogo de CPHs, atendidos no serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

Os pacientes que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE - Apêndice), permitindo o uso de uma alíquota do material já coletado para o processo do transplante.

Como critério de inclusão foram selecionados pacientes com minimamente 20 células CD34+/CD45+ por uL no sangue periférico.

O projeto obteve parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, local de realização da pesquisa sob o CAAE 91395818.7.0000.5411 e o número de parecer 2.763.476.

3.2. Amostra de sangue periférico

Foram utilizadas amostras de 5mL de sangue periférico, coletadas em tubo com anticoagulante (EDTA) de pacientes submetidos ao transplante autólogo, que se encontravam no 5º dia de mobilização, momento do pico de mobilização das CPH da medula para a periferia.

3.3 Preparação da solução preservante

Foram elaboradas soluções preservantes contendo diferentes combinações de compostos químicos, testados aleatoriamente, dada a dificuldade de encontrar na literatura ou mesmo em soluções preservantes comerciais, as composições detalhadas.

As soluções preservantes foram preparadas em fluxo laminar, previamente desinfetado com álcool 70% e luz UV. Elas foram denominadas pelas letras do

alfabeto, conforme eram desenvolvidas e testadas, totalizando nove soluções (denominadas: A; B; C; D; E; F; G; H; I).

Na primeira etapa, com o objetivo de avaliar qual das nove soluções apresentaria melhor desempenho quando testadas em amostra de um único indivíduo. Em princípio, foram realizadas quantificações de linfócitos T CD4+/CD8+, devido a abundante quantidade destas células em sangue periférico. Diferenciaram-se, entre as nove soluções preparadas, as quantidades utilizadas de cada reagente e também visando eliminar o maior número possível de vieses.

Cada teste foi executado em triplicata. As amostras preservadas foram mantidas refrigeradas de 2 a 8°C e as quantificações realizadas nos dias zero, 7, 20, 30, 40 e 50 dias, uma vez que o controle comercial tem validade de até 45 dias.

Optou-se pela solução que apresentou melhor desempenho, sendo esta denominada “Solução I”, a qual foi utilizada para preservar as amostras dos pacientes incluídos no estudo.

Ressalta-se que, em virtude do potencial de registro/patenteabilidade do produto desenvolvido, as fórmulas usadas para obtenção das soluções preservantes serão mantidas sob sigilo.

3.4 Preparo dos Controles de Qualidade Internos *in house*

Os tubos das amostras foram centrifugados por 10 minutos a 200x g. Então, foram retirados e descartados 1,5mL de plasma. O restante foi homogeneizado e, através da técnica de pipetagem reversa adicionou-se 1,5mL da amostra em 1,5mL de solução preservante. Este procedimento foi realizado a fim de se manter volume idêntico para a padronização do controle interno de qualidade, evitando diluição celular. As amostras preservadas foram mantidas refrigeradas de 2 a 8 °C.

3.5 Quantificação de CPHs por citometria de fluxo – Protocolo ISHAGE – Plataforma Única

Assim como feito rotineiramente, o controle interno comercial foi preparado de acordo com a metodologia empregada para quantificação das CPHs. Os Controles Internos *in house* foram igualmente preparados.

Foram utilizados tubos Trucount®, sendo adicionados 10uL do anticorpo monoclonal anti-CD34-PE, 10uL do anticorpo monoclonal anti-CD45-FITC; e 20uL

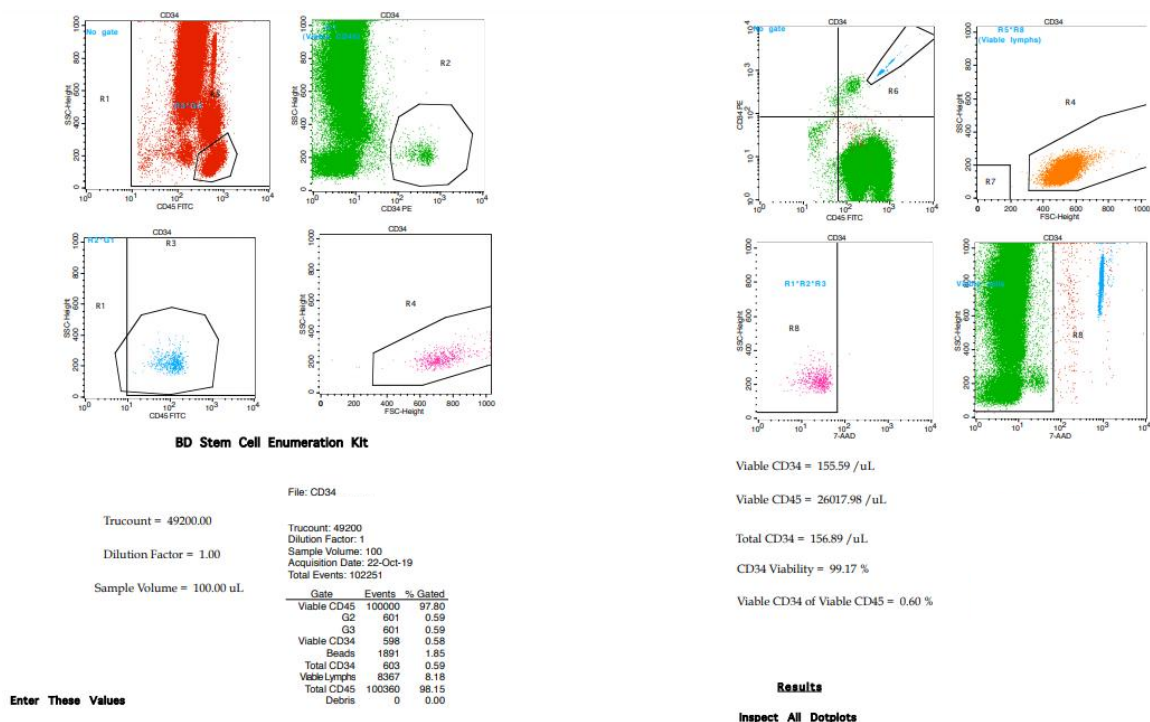
do marcador de viabilidade celular – 7AAD. Foi acrescentado o volume de 100uL da amostra preservada por pipetagem reversa, e então as amostras foram incubadas por 20 minutos no escuro. Adicionou-se 2mL de solução de lise, incubando por mais 10 minutos.

A leitura foi realizada em citômetro de fluxo modelo FACSCalibur® (BD). As quantificações foram realizadas nos dias “zero”, 7, 21, 35 e 49. Foram escolhidos dias múltiplos de sete para que as leituras fossem realizadas nos mesmos dias da semana (terças-feiras).

O protocolo ISHAGE é internacionalmente adotado, sendo padronizado o uso de marcadores, anticorpos e fluorocromos, além da padronização de *gates* sequenciais, permitindo ampla reprodutibilidade de resultados. É possível realizá-lo em plataforma dupla (leucometria em contador celular automatizado e fenotipagem por citometria) ou plataforma única, integralmente realizada no citometro de fluxo, fazendo uso de *beads*, gerando contagem relativa e absoluta, sendo a última a plataforma que garante melhor reprodutibilidade. Além dos parâmetros de tamanho e granulosidade, o protocolo também permite a seleção da população de CD34+, a partir da população de leucócitos que é marcada com CD45+. Utiliza-se também um marcador de viabilidade denominado 7-AAD, que é incluso na sequência de *gates*, para exclusão de células mortas. Deste modo, o coeficiente de variação interlaboratorial é reduzido, concedendo maior credibilidade aos resultados obtidos, em virtude da maior robustez do processo de enumeração de células CD34 por limitar potenciais fontes de imprecisão (MARTI, BACAL, 2013; SHUTHERLAND et al., 1996).

O protocolo ISHAGE preconiza a utilização de quatro histogramas conforme representado na figura 2.

FIGURA 2- Estratégia de *gates* para aquisição e análise pelo protocolo ISHAGE – Plataforma única.



Legenda: Estratégia sequencial de *gates* para identificação das CPHs CD34+/CD45+/7AAD-, ou seja, células tronco viáveis/uL de amostra avaliada (sangue periférico ou produto da aférese).

3.6 Análise estatística

Análises estatísticas foram realizadas no software Matlab® versão 2016. Realizou-se regressão linear a fim de se verificar a preservação e estabilidade amostral, comparando-se ao controle comercial.

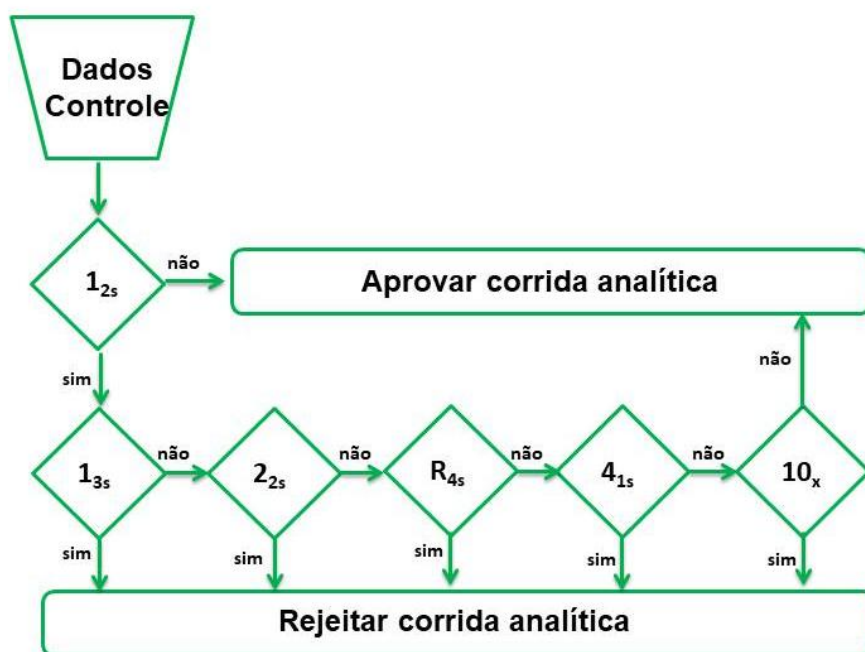
Para o controle comercial o limite de variação aceito é de $\pm 40\%$, por isso, foi adotado no controle *in house* o mesmo limiar.

Utilizaram-se gráficos de Levey-Jennings, que são validados para verificação de controles internos. Determinou-se como valor referencial, a quantificação celular obtida no dia zero. O limiar de variação adotado para o controle interno *in house* foi $\pm 40\%$, sendo estratificado a cada 20%, para fins de avaliação das Regras Múltiplas de Westgard para um nível de controle, considerando 20% de variação como um

desvio-padrão. Desta forma, foi possível analisar o desempenho dos CQIs sobre a ótica dos parâmetros estabelecidos nas Regras Múltiplas de Westgard.

As regras múltiplas de Westgard adotadas para análise de performance estão representadas no fluxograma abaixo (Figura 3).

Figura 3- Fluxograma das regras Múltiplas de Westgard para um nível de controle interno.



FONTE: Westgard, J. O. Multirule and "Westgard Rules": What are They?

Segue a descrição da aplicabilidade das regras múltiplas de Westgard:

- Regra 1_{2s}: Esta regra é violada quando uma medição extrapolar $\pm 2DP$. É uma regra de alerta, indicando possível erro na rotina. Se for violada deve-se aplicar a próxima regra 1_{3s}.

- Regra 1_{3s}: Rejeita-se quando um uma única medição extrapola o limite $\pm 3DP$;

- Regra 2_{2s}: Rejeita-se quando duas medições de controle consecutivas excederem o mesmo limite para cima ou para baixo de 2DP;

- Regra R_{4s} : Rejeita-se quando uma medição de controle exceder o limite de controle média + 2DP e a outra média - 2DP, em uma mesma corrida;
- Regra 4_{1s} : Rejeita-se quando quatro medições de controle consecutivas excederem o mesmo limite média $\pm 1DP$;
- Regra 10_x : Rejeita-se quando dez medições de controle consecutivas estiverem no mesmo lado em relação à média;

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 estão compilados os dados das quantificações de células CD34+ (valor absoluto), avaliados no período preconizado no estudo, tanto dos controles internos *in house* (pacientes de 1 a 8), quanto do controle interno comercial.

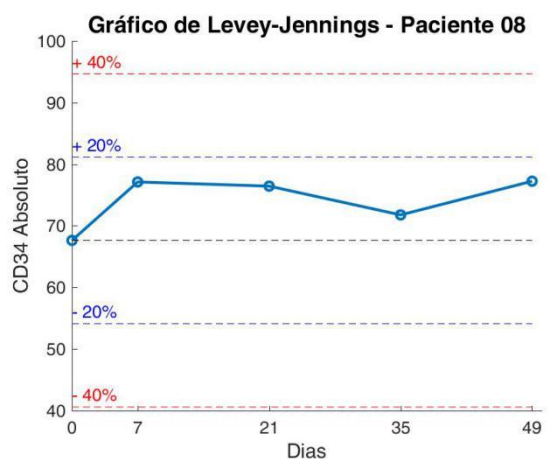
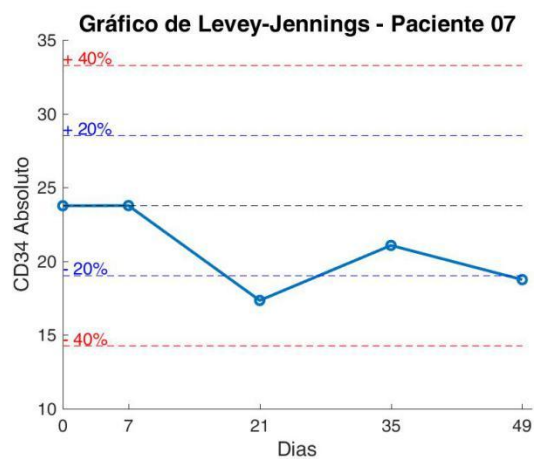
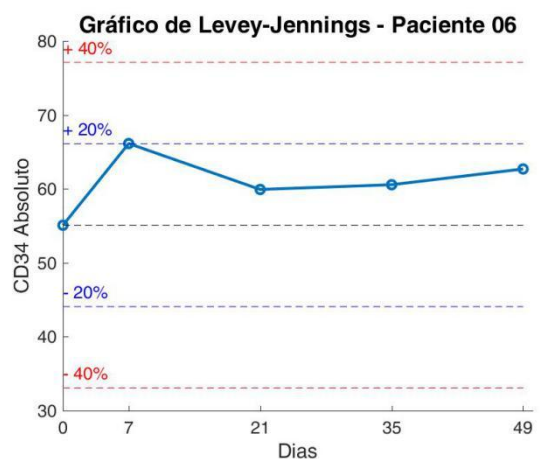
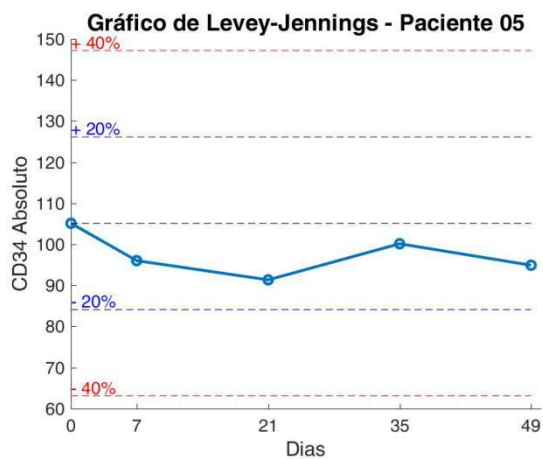
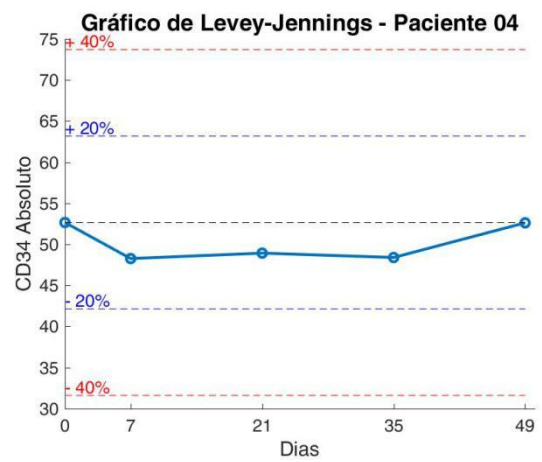
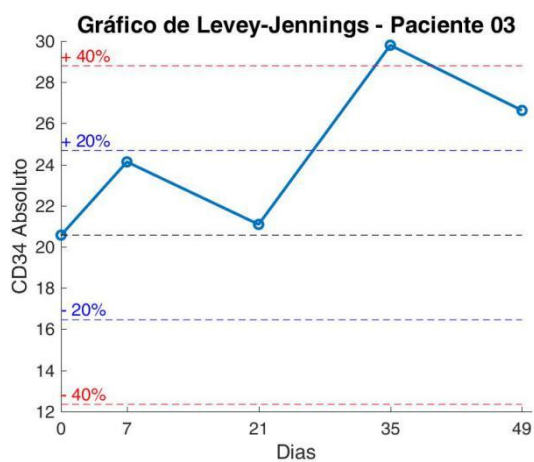
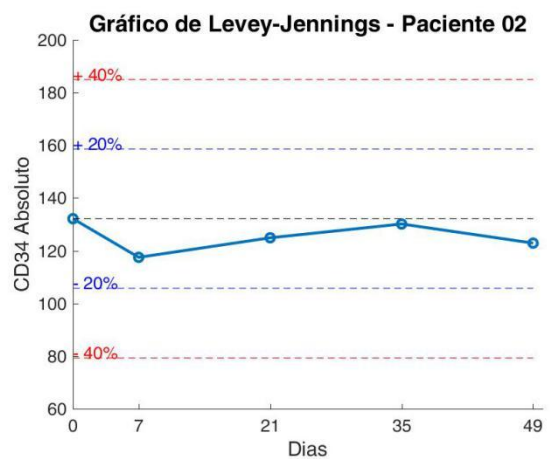
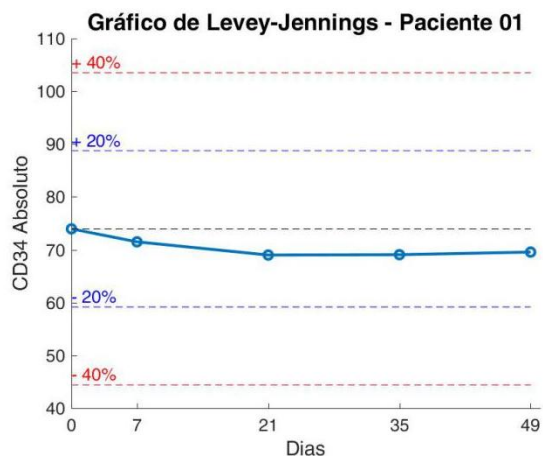
TABELA 1- Quantificação de CD34 viável (absoluto) nos controles internos: *in house* e comercial.

CD34 VIÁVEL ABSOLUTO/(uL)					
Controles Internos	D0	D7	D21	D35	D49
PAC 1	73,95	71,49	68,99	69,06	69,55
PAC 2	132,14	117,47	124,89	130,13	122,87
PAC 3	20,57	24,13	21,09	29,80	26,63
PAC 4	52,66	48,27	48,93	48,40	52,62
PAC 5	105,13	96,03	91,35	100,14	94,91
PAC 6	55,08	66,13	59,92	60,56	62,69
PAC 7	23,76	23,77	17,34	21,07	18,75
PAC 8	67,63	77,12	76,44	71,77	77,24
Controle Comercial	62,57	67,72	61,99	62,25	62,88

Legenda: Resultados absolutos de CD34 viável em uma cinética temporal, obtidos a partir da quantificação por citometria de fluxo dos controles internos *in house* (PAC 1 a 8) e comercial.

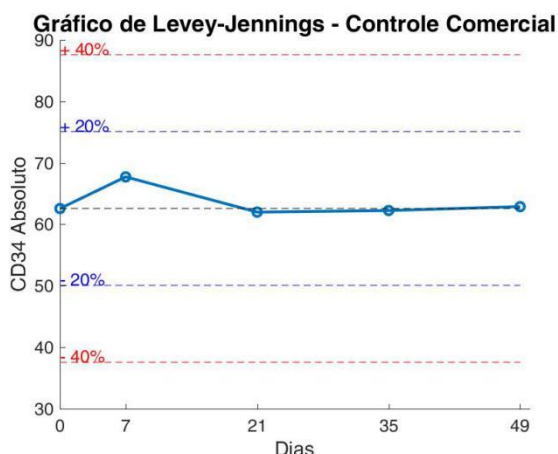
Ao realizar a avaliação do desempenho das amostras, foi possível observar que todas se mostraram eficientes na preservação, por até 49 dias de conservação, apresentando variação limitada aos níveis estabelecidos, inclusive, na maioria das amostras (75%) a variação não excedeu 20%, demonstrando estabilidade e adequada reprodutibilidade, conforme está reportado nos gráficos de Levey-Jennings (Figura 4).

Figura 4: Desempenho dos CQI *in house* para quantificação de CD34 absoluto, em 8 diferentes amostras de pacientes, representadas em gráficos de Levey-Jennings numa cinética temporal.



Legenda: *Valor referencial (medida do dia “zero”)*: Representada pela linha central tracejada preta; *Variação de 20%*: Representada pela linha tracejada azul; *Variação de 40%*: Representada pela linha tracejada vermelha.

Figura 5 - Gráfico Levey-Jennings: Desempenho da quantificação de CD34 absoluto durante cinética temporal de 49 dias – CONTROLE COMERCIAL



Ao avaliar os gráficos da Figura 4, observou-se que em 6 de 8 amostras dos pacientes, assim como no controle comercial (figura 5), a variação obtida limitou a $\pm 40\%$, portanto não violando a regra de alerta 1_{2s} , sendo possível, numa rotina diária, aprovar as corridas analíticas.

Na avaliação da amostra do paciente 3, houve extrapolação do limite de variação ($>40\%$), havendo desta forma quebra da regra de alerta 1_{2s} , que limita o aceite da variação até 2DP (ou seja, 20%), sendo necessário submeter às demais regras de Westgard. Neste contexto, após análise da performance, constatou-se que houve violação da regra 1_{3s} , mediante a extrapolação de 3 DP ($>30\%$), de modo que esta corrida deveria ser rejeitada.

A amostra do paciente 7, extrapolou numa medição dois DP ($>20\%$), havendo quebra da regra de alerta 1_{2s} . No entanto, não havendo quebra das demais regras que compõem o fluxograma, podendo a corrida ser aprovada.

Tais resultados são relevantes, visto que as amostras preservadas demonstraram eficiência semelhante aos controles de qualidade comerciais, estando dentro do intervalo aceito de $\pm 40\%$, conforme preconizado pelas empresas que comercializam controle de qualidade interno.

Segundo BASQUES (2009), as empresas que comercializam controles de qualidade interno, consideram um limite de variação mais amplo, devido a distribuição destes em diversos laboratórios com diferentes metodologias, analistas, insumos, entre outros fatores.

Para Santos e Zanusso Junior (2015), os valores que são estabelecidos dentro do limite preconizado, comumente por média e desvio-padrão, aprovam que o método analítico está funcionando corretamente. Nos casos em que os valores extrapolam o limite fornecido, pode-se sugerir erros ou problemas durante o processo.

Embora os valores de média e desvio-padrão sejam amplamente adotados em avaliações de desempenho de CQI, optamos neste estudo, em utilizar o percentual de variação.

No CQI comercial, os valores de média e desvio-padrão são determinados por avaliações interlaboratoriais, do mesmo analito (amostra). Neste caso, variáveis como transporte, armazenamento, diferentes equipamentos, diversos operadores/analistas, variedade de insumos (lotes, marcas, etc), compõem um conjunto de fatores que podem interferir no cálculo destes valores. Desta forma, influenciam nos valores de desvio-padrão estabelecido.

Assim sendo, acreditamos que o percentual de variação seria mais aplicável ao nosso estudo, visto que os resultados foram obtidos através de análises locais únicas, em mesmo equipamento, sob as mesmas condições, com menores fatores interferentes, o que influenciaria em valores muito baixos de desvio-padrão. Além disso, mesmo nos CQI comerciais, alguns lotes apresentam valores de média e desvio-padrão baixos (ex.: $8,70 \pm 0,53$), que são biologicamente pouco aplicáveis.

Os gráficos de Levey-Jennings foram utilizados para que fosse possível a visualização dos resultados obtidos, de modo que esses ficassem claros e facilitasse a verificação de adequação às regras múltiplas de Westgard e a variação da qualidade nos resultados.

A utilização de gráficos para monitoração de qualidade é empregada desde 1931, quando Shewharts propôs esta ideia para ser utilizada em fábricas. Os resultados que se encontravam acima da média e extrapolando dois desvios-padrão poderia indicar uma variação na qualidade. Em 1950, Levey e Jennings ofertaram a utilização dos gráficos de Shewharts em laboratórios clínicos, de modo que fosse possível uma verificação de maneira constante, além da verificação de erros de

maneira rápida. Até hoje, estes conceitos são amplamente adotados, e possibilitam avaliar se um processo está dentro do padrão de qualidade, num sistema de garantia de qualidade do produto oferecido (CARROL, PINNICK, CARROL, 2003).

Nas tabelas de 2 a 5 estão reunidos os dados das quantificações de CD45 viável (valor absoluto); CD34 total (absoluto); CD45 viável (percentual); CD34 viável (percentual), respectivamente, avaliados no período preconizado no estudo, tanto dos controles internos *in house* (pacientes de 1 a 8), quanto do controle interno comercial.

TABELA 2- Quantificação de CD45 viável (absoluto) nos controles internos: *in house* e comercial.

CD45 VIÁVEL ABSOLUTO/(uL)					
Controles Internos	D0	D7	D21	D35	D49
PAC 1	42018,58	42054,1	44222,22	42630,68	44374,08
PAC 2	39800,00	38897,58	41217,90	41841,88	40024,14
PAC 3	19781,31	21734,38	21089,44	22572,60	21306,21
PAC 4	14080,53	14238,90	16644,36	15175,04	17138,76
PAC 5	41393,9	42304,42	42887,93	45516,93	41811,85
PAC 6	59233,89	60670,73	60523,11	56074,77	61459,67
PAC 7	22414,58	22013,27	21677,56	21950,73	23143,68
PAC 8	15525,75	15032,88	15137,18	14239,10	14769,23
Controle Comercial	10732,98	10684,11	9829,39	10326,50	10382,26

Legenda: Resultados absolutos de CD45 viável em uma cinética temporal, obtidos a partir da quantificação por citometria de fluxo dos controles internos *in house* (PAC 1 a 8) e comercial.

TABELA 3- Quantificação de CD34 total (absoluto) nos controles internos: *in house* e comercial.

CD34 TOTAL (uL)					
Controles Internos	D0	D7	D21	D35	D49
PAC 1	84,46	75,28	72,97	72,47	79,30
PAC 2	134,92	119,80	131,07	135,15	128,88
PAC 3	22,55	26,95	22,35	31,60	30,25
PAC 4	57,03	51,26	52,26	55,99	56,39
PAC 5	114,23	99,42	99,07	103,78	103,69
PAC 6	63,37	69,16	64,15	83,72	89,47
PAC 7	32,28	33,90	22,33	23,48	19,21
PAC 8	72,09	84,33	82,80	73,47	83,00
Controle Comercial	64,72	70,39	64,54	65,45	69,52

Legenda: Resultados absolutos de CD34 total em uma cinética temporal, obtidos a partir da quantificação por citometria de fluxo dos controles internos *in house* (PAC 1 a 8) e comercial.

TABELA 4- Quantificação de CD45 viável (percentual) nos controles internos em relação aos leucócitos totais: *in house* e comercial.

CD45 VIÁVEL PERCENTUAL (%)					
Controles Internos	D0	D7	D21	D35	D49
PAC 1	98,29	98,81	98,88	98,83	98,82
PAC 2	98,57	98,74	98,81	98,78	98,74
PAC 3	96,45	97,75	97,65	97,77	97,68
PAC 4	95,77	96,71	97,07	96,75	97,26
PAC 5	97,52	98,81	98,81	98,91	98,86
PAC 6	98,68	99,15	99,16	99,12	99,19
PAC 7	97,03	97,73	97,7	97,81	97,95
PAC 8	94,61	96,87	96,86	96,72	96,84
Controle Comercial	95,46	95,66	95,31	95,57	95,56

Legenda: Resultados percentual de CD45 viável em uma cinética temporal, obtidos a partir da quantificação por citometria de fluxo dos controles internos *in house* (PAC 1 a 8) e comercial.

TABELA 5- Quantificação de CD34 viável (percentual) nos controles internos: *in house* e comercial.

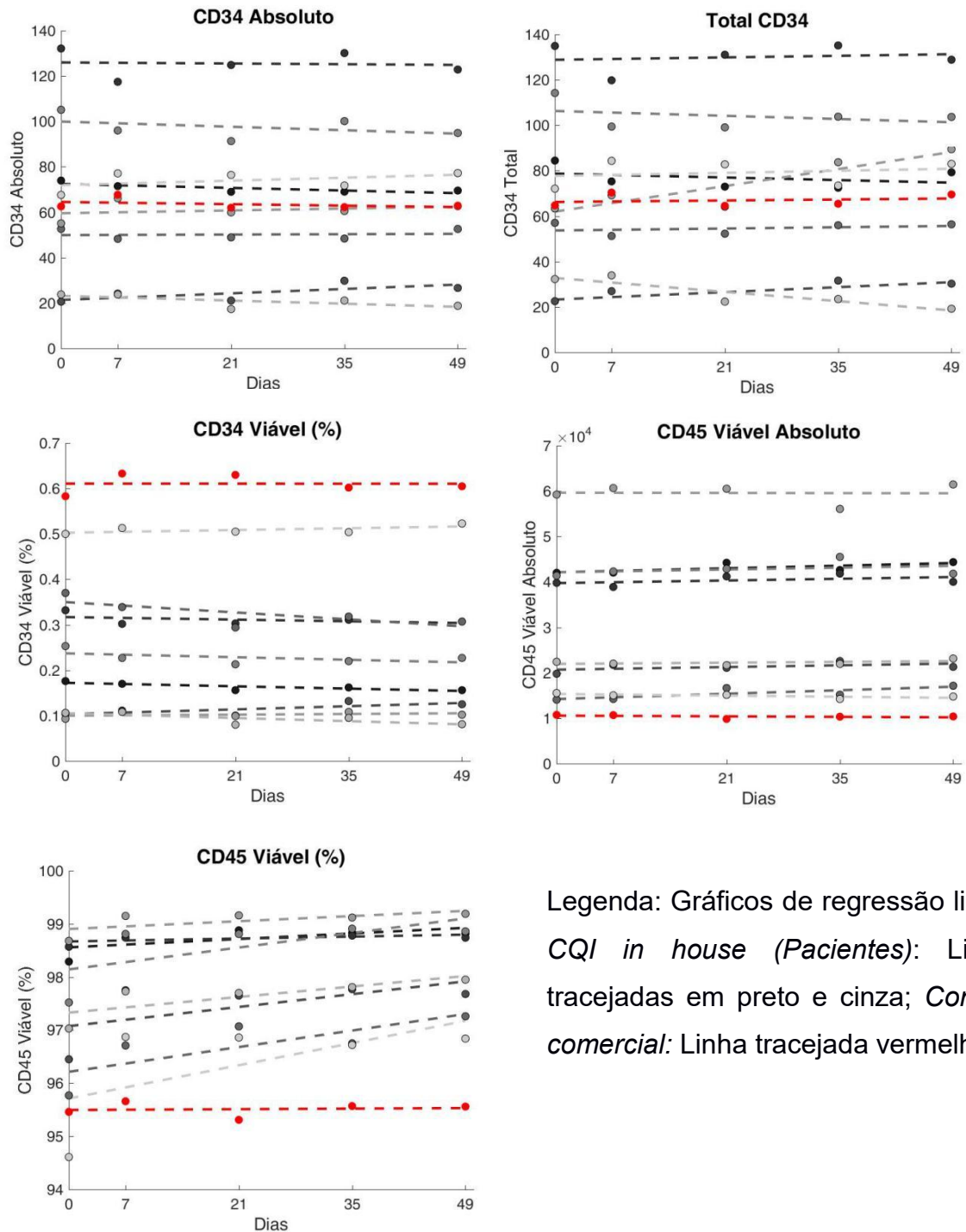
CD34 VIÁVEL PERCENTUAL (%)					
Controles Internos	D0	D7	D21	D35	D49
PAC 1	0,176	0,170	0,156	0,162	0,156
PAC 2	0,332	0,302	0,303	0,311	0,307
PAC 3	0,104	0,111	0,100	0,132	0,125
PAC 4	0,370	0,339	0,294	0,318	0,307
PAC 5	0,253	0,227	0,213	0,220	0,227
PAC 6	0,093	0,109	0,099	0,108	0,102
PAC 7	0,106	0,108	0,080	0,095	0,081
PAC 8	0,500	0,513	0,505	0,504	0,523
Controle Comercial	0,583	0,633	0,630	0,602	0,605

Legenda: Resultados percentual de CD34 viável em uma cinética temporal, obtidos a partir da quantificação por citometria de fluxo dos controles internos *in house* (PAC 1 a 8) e comercial.

Os gráficos de regressão linear foram elaborados a partir dados compilados nas tabelas de 1 a 5, com o intuito de analisar a estabilidade mantida pelas amostras com preservantes, durante os dias zero, 7, 21, 35 e 49, em comparação ao controle comercial.

Ao avaliar o comportamento das amostras, foi possível observar que todas se mostraram adequadamente estáveis por até 49 dias, conforme está reproduzido nos gráficos de Regressão Linear (FIGURA 6).

Figura 6 - Gráficos de regressão linear: Estabilidade da conservação dos CQIs (*in house* e comercial) durante cinética temporal de 49 dias, mediante avaliação de cada analito (CD34 absoluto; CD34 total; CD34 viável (%); CD45 absoluto; CD45 viável (%)).



Na análise da conservação amostral por regressão linear, a linha reta, sem inclinação, indica maior estabilidade. Quanto maior a inclinação, pior o desempenho do CQI.

Ao analisar os gráficos é possível observar que o controle *in house* também pode ser considerado estável, assim como o controle comercial, pois ambos se apresentam estáveis em todos os parâmetros analisados.

Segundo Mendes e Sumita (2010), a garantia da estabilidade da amostra complementa a validação e é significativamente importante na implantação de um novo ensaio, pois a degradação ou instabilidade da amostra pode levar a resultados inapropriados.

Foi possível avaliar que houve variações ao longo do tempo nas quantificações das amostras preparadas com conservantes, assim como houve no controle comercializado. Em amostras biológicas não há um valor único para determinada medição, existe uma distribuição de valores verdadeiros, quando realizam-se medições repetidas de um material estável e com condições idênticas (mesmo lote de reagentes, mesmo operador e equipamentos), sendo comum obter-se uma série de resultados distintos, que ocorrem devido a variações aleatórias normais em todo processo de medida, especialmente em avaliações biológicas (BASQUES, 2009; CASTILHO,UBIALI, CARVALHO, 2013)

Para que o controle de qualidade seja satisfatório, a escolha do material apropriado é importante, para que o procedimento mantenha estabilidade em longo prazo e pouca variabilidade. A amostra do controle de qualidade interno deve mimetizar o máximo possível a composição das amostras de pacientes (KINNS et. al, 2013; MILLER et al. 2011).

Deste modo, buscamos neste trabalho reproduzir a característica amostral da forma mais semelhante possível aos CQIs comercializados, embora as composições das soluções conservantes sejam protegidas para fins de registros ou patentes.

Nossos resultados demonstraram que as amostras preservadas mimetizaram o comportamento do CQI comercial, apresentando reprodutibilidade e distribuição celular adequadas.

Para Roncalio et al., (2019), os laboratórios de análises clínicas empregam sistemas de gestão de qualidade, programas internos e externos, com o objetivo de garantir resultados fidedignos aos seus clientes, no entanto essas rotinas não são capazes de detectar variações que ocorrem ao longo do tempo, que podem ter como

base vieses de lotes de reagentes e sistemas de análises, rotatividade de funcionários, transporte, armazenamento de amostras, mudanças de procedimentos.

A eliminação total de variabilidade analítica é algo impraticável, diante disso, torna-se necessário designar condições em que o monitoramento se mantenha dentro de limites aceitáveis, que irão garantir o nível de qualidade do processo analítico. O estabelecimento destes limites de variação deve ser criterioso, pois caso seja muito amplo, um elevado número de resultados serão considerados satisfatórios, uma vez que se encontrarão dentro do limite, podendo gerar transtornos, devido a presença de resultados fora dos padrões de conformidade. Se os limites apresentarem amplitude de variação reduzida, pode ocorrer rejeição de corridas analíticas com resultados satisfatórios. Esta situação de falsa rejeição acarretaria na repetição de exames e necessidade de verificação de possíveis erros, causando aumento de custos laboratoriais (BASQUES, 2009; CASTILHO, UBIALI, CARVALHO, 2013).

Diante dos resultados, podemos inferir que o desenvolvimento do CQI *in house* foi satisfatório, possibilitando reproduzir desempenho superponível ao observado nos CQI comerciais. Desta forma, poderíamos substituir em nosso serviço o uso do CQI comercial pelo desenvolvido *in house*, gerando significativa redução de custos, mantendo a qualidade do monitoramento do processo de quantificação de CPHs, a fim de encontrar e ajustar variações e possíveis erros nas diversas fases, pré-analítica, analítica e pós-analítica. Além disso, como etapas futuras, seria possível realizar aperfeiçoamentos no CQI *in house* visando minimizar o limite de variação aceitável, voltado principalmente para a verificação da reprodutibilidade diária, precisão, gerando produtos ainda melhores do que os disponíveis no mercado.

O produto gerado trata-se de uma solução preservante/conservante exclusiva, utilizada como CQI, passível de registro ou patente, validado para uso em imunofenotipagem de CPHs para fins de transplante autólogo, com desempenho semelhante ao de um controle de qualidade comercialmente disponível.

5. CONCLUSÃO

Foi desenvolvido controle de qualidade interno para a quantificação de CPHs, a partir da padronização de diferentes concentrações de soluções preservantes.

- Avaliou-se a estabilidade e a reprodutibilidade das imunofenotipagens após conservação numa cinética temporal;
- Fez-se análise estatística avaliando o desempenho do controle interno desenvolvido.
- O CQI desenvolvido apresentou desempenho satisfatório de modo compatível aos produtos comercializados com a mesma finalidade.

6. REFERÊNCIAS

BASQUES, F. V. Controle da qualidade de reagentes e insumos e gestão do processo de testagem para doenças transmissíveis por transfusão. *In*: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. **Técnico em hemoterapia**: livro texto. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. p. 197-203.

BASQUES, J. C. A estatística no controle de qualidade. *In*: BASQUES, J. C. **Usando controles no laboratório técnico**. Lagoa Santa (MG): Labtest Diagnóstica, 2009. p. 8-15. Disponível em: https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/11/Usando_Controles_no_Laboratorio_Clinico.pdf. Acesso em: 15 maio 2019.

BELK, W. P.; SUNDERMAN, F. W. A survey of the accuracy of chemical analysis in clinical analysis in clinical laboratories. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v. 17, p. 853-861, 1947.

BERLITZ, F. A. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 353-363, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 14 out. 2005.

CARROLL, T. A.; PINNICK, H. A.; CARROL, W. E. Probability and the Westgard Rules. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, Philadelphia, v. 33, n. 1, p. 113-114, 2003.

CARVALHO, J. M.; SOUZA, M. K.; BUCCHERI, V.; RUBENS, C. V.; KERBAUY, J.; OLIVEIRA, J. S. R. CD34-positive cells and their subpopulations characterized by flow cytometry analyses on the bone marrow of healthy allogenic donors. **São Paulo Med. J.**, São Paulo, v. 127, n. 1, p. 12-18, 2009.

CASTILHO, S.; UBIALI, E. M. A.; CARVALHO, M. A. Controle de qualidade de reagentes em imuno-hematologia. *In*: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. **Técnico em hemoterapia**: livro texto. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. p. 171-254.

CHAVES, C. D. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 352, 2010.

COMBARIZA, J. F.; BARCO, G.; ESTRADA, A.; JARAMILLO, S.; ARANGO, M. Recuento de células CD34+ en sangre periférica como predictor de adecuada recolección de progenitores hematopoyéticos para trasplante autólogo. **IATREIA**, Medellín, v. 29, n. 4, p. 424-432, 2016.

DELAMAIN, M. **Correlação entre a quantidade de células CD34+ circulantes e a coleta por aférese de CPP em pacientes onco-hematológicos.** Dissertação - (Mestrado em Ciência Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Programa de Ciências Médicas do Departamento de Medicina, Campinas, 2004. Disponível em: <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/309696> Acesso: 20 fev. 2019.

DUARTE, F. B.; PRADO, B. P. A.; VIEIRA, G. M. M.; COSTA, L. J. Mobilization of hematopoietic progenitor cells for autologous transportation: consensus recommendations. **Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 62, p. 10-15, 2016. Supl. 1.

FONSECA, I. M. A. Erros experimentais: uma abordagem pedagógica: parte I. **Bol. Soc. Port. Quim.**, Lisboa, n. 35, p. 37-41 .

GAMBELL, P.; HERBERT, K.; DICKINSON, M.; STOKES, K.; BRESSEL, M.; WALL, D.; HARRISON, S.; PRINCE, H. M. Peripheral blood CD341 cell enumeration as a predictor of apheresis yield: an analysis of more than 1,000 collections. **Biol. Blood Marrow Transplant.**, Charlottesville, v. 18, p. 763-772, 2012.

JANSEN, J.; HANKS, S.; THOMPSON, J. M.; DUGAN, M. J.; AKARD, L. P. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. **J. Cell Mol. Med.**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 37-50, 2005.

KINNS, H.; PITKIN, S.; HOUSLEY, D.; FREEDMAN, D. B. Internal quality control: best practice. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 66, p. 1027–1032, 2013.

LEMOES, N. E.; FARIAS, M. G.; KUBASKI, F.; SCOTTI, L.; ONSTEN, T. G. H.; BRONDANI, L. A.; WAGNER, S. C.; SEKINE, L. Quantification of peripheral blood CD34⁺ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: a single center experience. **Hematol., Transfus. Cell Ther.**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 213-218, 2018.

MARQUES, A. C. B.; PROENÇA, S. F. F. S.; MACHADO, C. A. M.; GUIMARÃES, P. R. B.; MAFTUM, M. A.; KALINKE, L. P. Qualidade de vida nos primeiros seis meses pós-transplante de células-tronco hematopoéticas. **Texto Contexto - Enferm.**, Florianópolis, v. 26, n. 3, p. e5040016, 2017.

MARTI, L. C.; BACAL, N. S. Determinação de células CD34 positivas. In: DUARTE, A.; SALES, M. M.; VASCONCELOS, D. M. **Citometria de fluxo aplicações no laboratório clínico e de pesquisa:** citometria de fluxo: princípios metodológicos de funcionamento. Rio de Janeiro: Atheneu, 2013. p. 381-388.

MASSIN, F.; HUILLI, C.; DECOT, V.; STOLTZ, J. F.; BENSOUSSAN, D.; LATGER-CANNARD, V. Validation of a single-platform method for hematopoietic CD34⁺ stem cells enumeration according to accreditation procedure. **BioMed. Mater. Eng.**, Amsterdam, v. 25, p. 27–39, 2015.

MENDES, M. E.; SUMITA, N. M. Controle da qualidade em testes laboratoriais remotos. In: ADAGMAR ANDRIOLO, A.; BALLARATI, C. A. F.; MELO, M. R.; SUMITA, N. M. (coord.). **Diretrizes para a gestão e garantia da qualidade de Testes Laboratoriais Remotos (TLR) da Sociedade Brasileira de Patologia**

Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML). 2. ed. Barueri: Minha Editora, 2016. p. 59-87.

MENDES, M. E.; SUMITA, N. M. Seleção e qualificação de sistema analítico. *In*: OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M. E. (org.). **Gestão da fase analítica do laboratório**: como assegurar a qualidade na prática. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010. p.15-38.

MENDRONE JUNIOR, A. Sangue periférico como fonte de células para terapia celular. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 31 , n. 1, p. 19-24, 2009.

MILLER, W. G.; EREK, A.; CUNNINGHAM, T. D.; OLADIPO O.; SCOTT, M. G.; JOHNSON, R. E. Commutability limitations influence quality control results with different reagent lots. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 57, p. 76-83, 2011.

ORIGA, A. F.; OTTOBONI, M. A. P. Controle da qualidade dos componentes do sangue. *In*: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. **Técnico em hemoterapia**: livro texto. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. p.123-142.

PLEBANI, M. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. **Clin. Chim. Acta.**, Amsterdam, v. 404, p. 16-23, 2009.

PLEBANI, M.; CERIOTTI, F.; MESSERI, G.; OTTOMANO, C.; PANSINI, N.; BONINI, P. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v. 44, n. 2, p. 150-160, 2006.

RICÓS, C.; GARCIA-VICTORIA, M.; DE LE FUENTE, B. Quality indicators and specifications for the extra-analytical phases in clinical laboratory management. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v. 42, n. 6, p. 578-582, 2004.

ROCK, G.; CHIN-YEE, I.; CANTIN, G.; GIULIVI, A.; GLUCK, S.; KEATING, A.; KEENY, M.; KLASSEN, J.; SUTHERLAND, R. Quality assurance of progenitor cell content of apheresis products: a comparison of clonogenic assays and CD34⁺ enumeration. **Transfus. Med.**, Oxford v. 10, p. 67–75, 2000.

RONCALIO, A. C.; GALGOWSKI, C.; CORREA, M. A.; LANGE, L. A.; YAMANAKA, C. N.; RENSI, T. K.; CORDOVA, C. M. M. Análise longitudinal da qualidade dos exames laboratoriais em um estudo de base populacional. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Berlin, v. 55, n. 4, p. 348-359, 2019.

SALES, M. M.; VASCONCELOS, D. M.; DUARTES, A. J. S. citometria de fluxo: princípios metodológicos de funcionamento. *In*: DUARTE, A. J. S. (coord.). **Citometria de Fluxo**: aplicações no Laboratório Clínico e de pesquisa. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 3-19.

SANTIS, G. C. Células-tronco hematopoéticas terapia celular. *In*: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Gestão do Trabalho e da Educação na Saúde. Departamento de Gestão da Educação na Saúde. **Técnico em hemoterapia**: livro texto. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. p. 245-254.

SANTOS, A. P.; ZANUSSO JUNIOR, G. Controle de qualidade em Laboratórios clínicos. **Rev. Uningá.**, Maringá, v. 45, p. 60-67, 2015.

SENEGAGLIA, A. C.; REBELATTO, C. L. K.; SUSS, P. H.; BROFINAM, P. R. S. Expansão de células-tronco da medula óssea e do sangue de cordão umbilical Humano. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v. 1, n. 31, p. 9-14, 2009.

SHUTHERLAND, D. R.; ANDERSON, L.; KEENEY, M.; NAYAR, R.; CHIN-YEE, I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. **J. Hematol.**, New York, v. 5, p. 213-226, 1996.

TING YU, J.; BIN CHENG, S.; YANG, Y.; CHANG, K. H.; HWANG, W. L.; TENG, C. L. Circulating hematopoietic progenitors and CD34+ cells predicted successful hematopoietic stem cell harvest in myeloma and lymphoma patients: experiences from a single institution. **J. Blood Med.**, New Zealand, v. 7, p. 7-11, 2016.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol.**, Cambridge, v. 12, n. 11, p. 502-508, 2002.

VIEIRA, K. F.; SHITARA, E. S.; MENDES, M. E.; SUMITA, N. M. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, São Paulo, v. 47, n. 3, p. 201-210, 2011.

WESTGARD, J. O. **Multirule and “westgard rules”: what are they?**. Tradução ControlLab. Rio de Janeiro, 2002. Disponível em: https://controllab.com/pdf/westgard_o_que_sao.pdf. Acesso em: 15 jan. 2018.

7. APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

RESOLUÇÃO 466/2012

(Doadores de CPH autologa)

CONVIDO, o(a) senhor(a) _____

_____ portador(a) do RG nº: _____, residente na _____

_____ para participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Validação de controle de qualidade interno *in house* para quantificação de células progenitoras hematopoéticas CD34⁺/CD45⁺”, que será desenvolvido por mim Francielle Ramalho Rocha, biomédica, com orientação da profissional biomédica e Professora Dra. Marjorie de Assis Golim da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Estou desenvolvendo um controle de qualidade laboratorial para células progenitoras hematopoéticas. Para que eu possa obter resultados preciso coletar 5mL do seu sangue em um único momento, este sangue coletado será utilizado logo após a coleta para a realização de quantificação de Células Progenitoras Hematopoéticas. O risco com a coleta de sangue será a picada da agulha, podendo ou não surgir uma mancha roxa, que desaparecerá brevemente.

Seu benefício em participar será contribuir para que possamos desenvolver um programa de controle de qualidade próprio, o que pode garantir resultados de exames realizados consistentes e reprodutíveis, melhorando a qualidade da quantificação de células progenitoras hematopoéticas CD34⁺/CD45⁺ usadas para transplante de medula óssea.

Fique ciente de que sua participação neste estudo é voluntária e que mesmo após ter dado seu consentimento para participar da pesquisa, você poderá retirá-lo a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na continuidade do seu tratamento.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será elaborado em 2 vias de igual teor, o qual 01 via será entregue ao senhor (a) devidamente rubricada, e a outra via será arquivada e mantida pelos pesquisadores por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Qualquer dúvida adicional você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa através dos telefones (14) 3880-1608 ou 3880-1609 que funciona de 2ª a 6ª feira das 8:00 às 11:30 e das 14:00 às 17:00h, na Chácara Butignolli s/nº em Rubião Júnior – Botucatu - São Paulo. Os dados de localização dos pesquisadores estão abaixo descritos.

Após terem sido sanadas todas minhas dúvidas a respeito deste estudo, CONCORDO EM PARTICIPAR de forma voluntária, estando ciente que todos os meus dados estarão resguardados através do sigilo que os pesquisadores se comprometeram. Estou ciente que os resultados desse estudo poderão ser publicados em revistas científicas, sem no entanto, que minha identidade seja revelada.

Botucatu, ____/____/____

Pesquisador

Participante da Pesquisa

Nome: Francielle Ramalho Rocha

Endereço: Hemocentro de Botucatu - Distrito de Rubião Júnior S/Nº – Campus da UNESP - Botucatu – SP

Telefone: 3811-6041 ramal 231 ou (14)99675-4526

Nome: Prof.^a Dr.^a Márjorie de Assis Golim

Endereço: Hemocentro de Botucatu - Distrito de Rubião Júnior S/Nº – Campus da UNESP - Botucatu – SP

Telefone: 3811-6041