

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2024.



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).

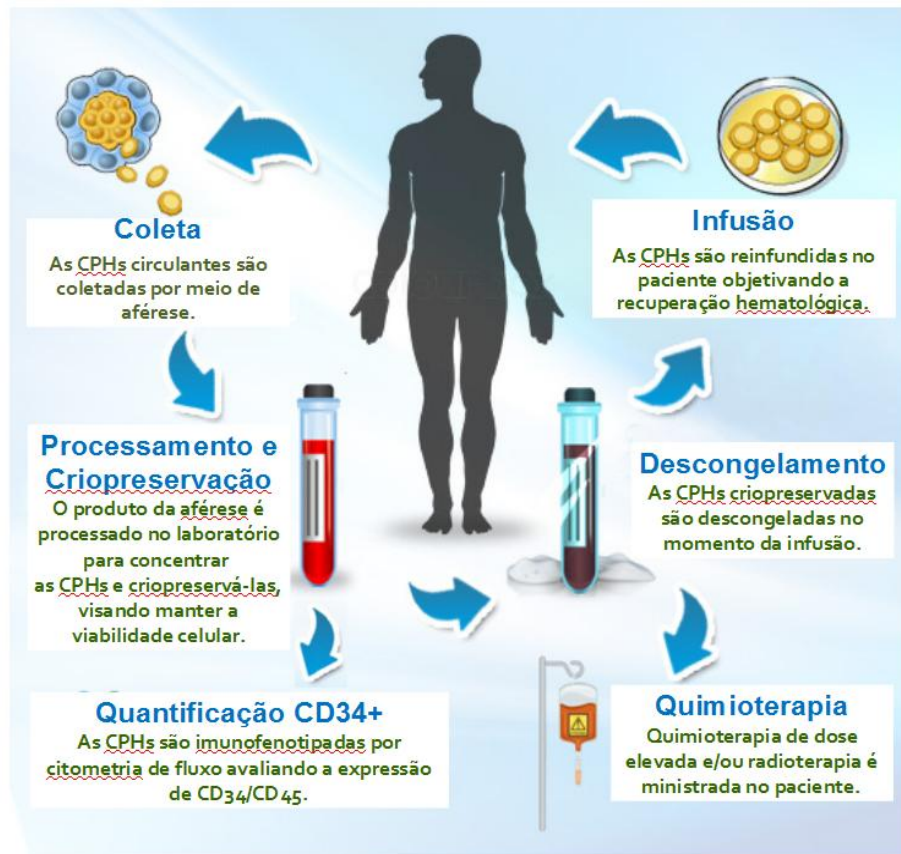
As CPHs são de grande importância para os transplantes de medula óssea, autólogos e alogênicos, procedimentos estes realizados para o tratamento de pacientes com doenças hematológicas. Para que as terapias realizadas tenham resultados satisfatórios, se faz necessária a expansão do número das CPHs, mediante 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+.

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 CD34⁺ 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.