

REQUISITOS



Logotipos:

Copyright© Associação Brasileira de Histocompatibilidade (ABH)

Copyright© PAQABH - Programa de Acreditação da Qualidade da Associação Brasileira de Histocompatibilidade

REQUISITOS PAQABH versão 03/2021

1. Objetivos
2. Referências e Definições
3. Sistema de Gestão da Qualidade
4. Responsabilidade da Direção
5. Gestão de Recursos
6. Requisitos Técnicos
7. Medição, Análise e Melhoria

Páginas:50

Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte deste livro poderá ser reproduzida, por qualquer processo, sem a permissão expressa da Associação Brasileira de Histocompatibilidade.

Edição - 2021

Impresso no Brasil
Printed in Brazil

1. Objetivos

1.1. Introdução

Esta norma especifica os requisitos necessários para a concepção de um sistema de gestão da qualidade para Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética.

1.2. Generalidades

A presente norma tem como objetivo estabelecer o referencial técnico do sistema de qualidade adequado às características dos Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética, incluindo os requisitos exigidos pelas regulamentações nacionais aplicáveis.

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que desejarem se certificar conforme a presente norma devem consultar o Regimento do Programa de Acreditação da Qualidade da ABH.

2. Referências e Definições

2.1. Referencias

Resolução RDC ANVISA n.º 61, de 1 de dezembro de 2009. Regulamentação técnica para o funcionamento dos Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética com atividades para fins de transplantes.

Portaria de Consolidação n.º 4 de 28 de setembro de 2017 do MS/GM que dispõe sobre a regulamentação técnica do Sistema Nacional de Transplantes (SNT)

Portaria n.º 2600/GM, publicada em 21 de outubro de 2009, que dispõe sobre a regulamentação técnica do Sistema Nacional de Transplantes (SNT). Foi substituída pela Portaria de Consolidação N.º 4 de 28/09/2017.

NBR ISO 9000:2000, Sistemas de Gestão da Qualidade - Fundamentos e vocabulários.

NBR ISO 9001:2008, Sistemas de Gestão da Qualidade - Requisitos.

2.2. Definições

Para efeito da presente norma, ficam válidas as seguintes definições:

ABH: Associação Brasileira de Histocompatibilidade.

Acurácia: Capacidade do teste em fornecer os resultados o mais próximo possível do valor verdadeiro. A acurácia pode ser avaliada utilizando-se como amostra soluções com concentrações conhecidas e variadas, soros controle positivo ou negativo, soros com especificidades de anticorpos anti-HLA conhecidas, células de referência com tipificações HLA conhecidas.

AGH: Antiglobulina humana.

Alelos não resolvidos: Alelos ou genótipos que não foram excluídos no resultado final.

Alvará Sanitário/ Licença Sanitária/ Licença de Funcionamento: Documento expedido pelo órgão sanitário competente estadual, municipal ou federal, que libera o funcionamento dos estabelecimentos que exerçam atividades sob regime de vigilância sanitária.

Ambiente: Espaço fisicamente determinado e especializado para o desenvolvimento de determinada (s) atividade (s), caracterizado por dimensões e instalações diferenciadas. Um ambiente pode constituir-se de uma sala ou de uma área.

Ambiguidade: Resultado de teste que pode ser interpretado de dois ou mais modos possíveis.

Amostra biológica: Sangue, linfonodo, baço, células de mucosa bucal, saliva e outros materiais biológicos.

Analito: Componente ou constituinte de material ou amostra biológica passível de pesquisa ou análise por meio de sistema analítico.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Área: Ambiente aberto, sem paredes, em uma ou mais de suas faces.

ASHI: *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics.*

Auditorias de Acreditação: São auditorias realizadas para a verificação da aderência do sistema de gestão da qualidade do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética aos requisitos do Programa de Acreditação da Qualidade da ABH, contemplando todos os requisitos do nível em avaliação.

Auditorias de Renovação da Acreditação: São auditorias realizadas dentro do período de vigência do certificado, que se aplicam ao término do período de validade da acreditação, após 24 meses, contemplando todos os requisitos do nível em avaliação.

Barcode ou tags de indexação (em relação a NGS): Marcação molecular de amostras com códigos baseados em sequência única, consistindo tipicamente de três ou mais pares de bases (geralmente na sequência do adaptador) permitindo agrupar múltiplas amostras.

Biossegurança: Condição de segurança alcançada por um conjunto de ações destinadas a prevenir, controlar, reduzir ou eliminar riscos inerentes às atividades que possam comprometer a saúde humana, animal e o meio ambiente.

CALH: Comissão de Acreditação de Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética.

Calibração: Conjunto de operações que estabelece, sob condições especificadas, a correspondência entre valores indicados por um instrumento, sistema de medição ou material de referência, e os valores correspondentes estabelecidos por padrões.

Certificado de Conformidade: Documento público atribuído ao Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética solicitante, emitido pela ABH.

CGSNT: Coordenação Geral do Sistema Nacional de Transplantes.

Cliente: Pessoa física ou jurídica para quem o Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética solicitante trabalha. Pode ou não corresponder ao usuário final. O laboratório solicitante, na determinação das exigências a que deve atender, pode identificar outras partes interessadas pelo seu sistema de gestão da qualidade, além do cliente, a seu critério.

CNCDO: Centrais de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos que são unidades executivas das atividades do Sistema Nacional de Transplantes conforme o Decreto n.º 2.268, de 30 de junho de 1997, que regulamenta a Lei n.º 9.434, de 4 de fevereiro de 1997.

CNES: Cadastro Nacional de Estabelecimento de Saúde.

Cobertura (em relação ao NGS): A porcentagem de bases chamadas a uma profundidade predeterminada para uma região genômica de interesse.

Controle de Qualidade: Técnicas e atividades operacionais utilizadas para monitorar o cumprimento dos requisitos da qualidade especificados.

Controle de Qualidade Externo: Avaliação do desempenho de sistemas analíticos por meio de testes de proficiência, análise de padrões certificados e comparações interlaboratoriais.

Controle de Qualidade Interno: Avaliação do desempenho de sistemas analíticos mediante comparações intralaboratoriais por meio de procedimentos conduzidos simultaneamente aos exames de rotina.

CIWD: *Common, Intermediate and Well-Documented*. Sigla em inglês para classificar os alelos HLA em 4 categorias de frequência segundo o catálogo versão 3.0.0 baseado em dados de diversos registros de doadores no mundo (Hurley CK, et al. 2020. HLA. 1-16. Doi. 10.1111/tan.13811)

Alelos comuns tem frequência ≥ 1 em 10.000, intermediários tem frequência ≥ 1 em 100.000 e bem documentados tem ≥ 5 ocorrências em pelo menos uma população estudada.

DTT: Ditiotreitól ($C_4H_{10}O_2S_2$).

Dados Brutos: Dados dos testes laboratoriais que requerem análise e interpretação para obtenção do resultado final.

Doador aparentado: Doador consanguíneo.

Doador Não Aparentado: Doador não consanguíneo.

EFI: European Federation for Immunogenetics.

ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*): Teste imuno-enzimático.

Especificidade: Significa a probabilidade de um teste ser negativo quando um determinado analito estiver ausente.

Fase pré-analítica: Inclui a requisição do exame pelo médico, a orientação sobre a coleta, o procedimento de coleta e identificação, transporte até o laboratório, recebimento, registro, distribuição e armazenamento da amostra biológica até o início da realização da análise.

Fase analítica: Inclui equipamentos, reagentes, corantes, demais materiais e o conjunto de procedimentos com descrição específica para cada método utilizado na realização das análises.

Fase pós-analítica: Inclui os procedimentos relacionados à obtenção de resultados válidos das análises até a emissão e o envio do laudo.

Garantia da Qualidade: Conjunto de atividades planejadas, sistematizadas e implementadas com o objetivo de cumprir os requisitos da qualidade especificados.

HLA (*Human Leukocyte Antigens*) /Antígenos Leucocitários Humanos: São os antígenos principais de histocompatibilidade, que constituem alvo de respostas imunológicas (alorreatividade) aos órgãos, tecidos e células transplantados. A alorreatividade pode ocorrer na via da rejeição (células

imunológicas do receptor) ou na via da doença do enxerto contra o hospedeiro (células imunológicas do doador).

Haplótipos HLA: Conjunto de alelos dos genes HLA presentes em um dos cromossomos do par homólogo número seis.

IgM: Imunoglobulina M

IMGT/HLA (www.ebi.ac.uk/imgt/hla/): Website especializado em sequências de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade humano (MHC = Major Histocompatibility Complex). Esse banco de dados é parte do projeto internacional ImMunoGeneTics (IMGT).

Laboratório solicitante: É o Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética que deseja obter sua acreditação pela ABH.

Laudos: Documento que contém os resultados das análises laboratoriais, validados e autorizados pelo responsável técnico ou outro profissional de nível superior legalmente habilitado.

Material de controle: Reagente ou amostra biológica que testa a exatidão, precisão ou funcionalidade de um sistema de teste.

Não conformidade: Não atendimento a um requisito do Programa de Acreditação da Qualidade da ABH.

NIH: *National Institutes of Health.*

NMDP (*National Marrow Donor Program*): Registro norte-americano de doadores voluntários de medula óssea.

MS: Ministério da Saúde.

Observações: São sugestões de melhoria ou dúvidas encontradas pelo auditor durante o processo de acreditação. Não é fator impeditivo para a acreditação.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reação em cadeia da polimerase

Pipeline da Informática (em relação ao NGS): O trabalho computacional através do qual dados brutos de leituras de sequenciamento, obtidos de uma plataforma particular do NGS, são processados para obter a genotipagem de HLA.

Os elementos específicos do pipeline incluem: (1) os algoritmos individuais, cada um desempenha uma tarefa específica executada por um software em uma ordem específica (por exemplo, desmultiplexação ou alinhamento de leituras ou genotipagem HLA), (2) a estrutura de gerenciamento do fluxo de trabalho onde entradas e saídas de diferentes módulos/software são devidamente coordenadas, e (3) a infra-estrutura completa do computador, incluindo sistema operacional, especificações de hardware, seja local ou em nuvem e as bases de dados de referência (IMGT/HLA) para processar grandes volumes de dados NGS de maneira escalável.

PRA (*Panel Reactive Antibody*): Reatividade de anticorpos contra painel, expressa em percentual de células do painel contra os quais os anticorpos reagiram.

PRA Virtual/PRA Calculado: Porcentagem de reatividade de anticorpos contra painel calculada a partir da reação esperada dos anticorpos específicos detectados no soro ante um painel de fenótipos HLA.

Precisão: Reprodutibilidade do teste, isto é, corresponde ao grau de dispersão dos resultados de determinações repetidas, em uma mesma amostra.

Primer: Oligonucleotídeo sintético que se liga por complementaridade, sob condições definidas, a uma sequência-alvo de um gene. Um par de primers possibilita a iniciação da amplificação do DNA.

Profundidade de cobertura (em relação a NGS): O número de leituras de sequências individuais que se alinham em determinada posição de nucleotídeo, frequentemente considerado para definir a confiabilidade ou a qualidade da sequência.

Prova cruzada virtual: Uma avaliação sobre compatibilidade imunológica baseada no perfil de aloanticorpos do paciente comparado com os antígenos de histocompatibilidade do doador, predizendo o resultado do teste prova cruzada.

REDOME: Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea.

REME: Registro Nacional de Receptores de Medula Óssea.

RT: Responsável Técnico do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética nomeado em regimento interno do Laboratório. Não há a obrigatoriedade de o Responsável Técnico do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética ser o mesmo Responsável Técnico da Instituição na qual o Laboratório está inserido.

Sala: Ambiente envolto por paredes em todo o seu perímetro e uma porta.

SBT (*Sequence Based Typing*): Método de tipificação molecular que se baseia no sequenciamento de genes HLA.

Sensibilidade: Significa a probabilidade de um teste ser positivo quando um determinado analito estiver presente.

Sistema de Gestão da Qualidade: Estrutura organizacional, responsabilidades, procedimentos, atividades, capacidades e recursos que, em conjunto, têm por objetivo assegurar que os produtos/serviços satisfaçam às necessidades e expectativas dos clientes.

SNT: Sistema Nacional de Transplantes.

Sonda: Oligonucleotídeo sintético que se liga por complementaridade, sob condições definidas, e identifica a presença de sequências-alvo de um gene.

SSO (*Sequence Specific Oligonucleotides*): Método de tipificação molecular que se baseia na hibridização de um DNA teste com um conjunto de oligonucleotídeos sequência-específicos. O padrão de reatividade do DNA teste com as sondas permite identificar um alelo ou um grupo de alelos.

SSP (*Sequence Specific Primers*): Método de tipificação molecular que se baseia na amplificação de um DNA teste com um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores (primers) sequência-específicos. O padrão de amplificação do DNA teste com os primers permite identificar um alelo ou um grupo de alelos.

TCTH: Transplante de células-tronco hematopoéticas.

Tipificação de alta resolução: Um genótipo HLA de alta resolução é definido como um alelo ou conjunto de alelos que codificam a mesma sequência de proteína para o sítio de reconhecimento antigênico (SRA). Os resultados de tipificação HLA de alta resolução devem conter apenas um genótipo sem ambiguidade ou podem conter vários genótipos alternativos se apenas uma combinação incluir dois alelos comuns e/ou intermediários (**CIWD v3.0.0**), com exceção de alelos nulos; genótipos alternativos contendo alelo nulo listado tanto como comum, intermediário ou bem documentado deve ser resolvido.

Tipificação de baixa resolução: Um genótipo HLA de baixa resolução é definido como suficiente para atribuir genótipos ao nível de subtipos sorológicos. Alguns alelos podem exigir resultados de genótipo com 2 campos para satisfazer esse requisito. Uma lista de subtipos sorológicos pode ser acessada em <http://hla.alleles.org/nomenclature/index.html>.

Tipificação de verificação: Tipificação HLA realizada com uma amostra independente (nova amostra), com a proposta de verificação da concordância entre as tipificações inicial e atual. A concordância não requer níveis idênticos de resolução entre as duas tipificações.

Validação: Sistema para testar novos métodos ou novos reagentes demonstrando que permitem a obtenção de resultados com acurácia. A validação de um novo método pode ser por comparação com resultados de outro laboratório qualificado ou por extensa comparação com resultados de outros métodos já aprovados. A validação de novos lotes de reagentes ou de diferentes envios do mesmo lote pode ser feita com amostras cujos resultados já são conhecidos.

3. Sistema de Gestão da Qualidade

3.1. Requisitos gerais

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer, documentar, implementar e manter um sistema de gestão da qualidade e melhorar continuamente a sua eficácia de acordo com os requisitos desta norma, assegurando que:

- a) Os processos necessários para o sistema de gestão da qualidade sejam determinados e que as exigências sejam cumpridas;
- b) Os critérios e métodos necessários para garantir a eficácia de operação e controle desses processos sejam determinados;
- c) Os recursos e as informações necessárias para apoiar a operação desses processos estejam disponíveis;
- d) Sejam tomadas ações necessárias para atingir os resultados planejados e a melhoria contínua desses processos.

3.2. Requisitos de Documentação

3.2.1. Generalidades

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer e manter políticas e procedimentos em todas as fases do processo de realização dos exames (pré-analítico, analítico e pós-analítico), bem como os sistemas gerais do laboratório.

A documentação obrigatória do sistema de gestão da qualidade deve incluir:

- a) Declarações documentadas da política da qualidade e dos objetivos da qualidade;
- b) Manual da qualidade;
- c) Procedimentos documentados requeridos por esta norma.

3.2.2. Manual da Qualidade

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer e manter um manual da qualidade apresentando as diretrizes empregadas para o gerenciamento da qualidade e o escopo do seu sistema de gestão da qualidade. Este manual deve incluir os procedimentos documentados estabelecidos para o sistema de gestão da qualidade ou referência a eles.

3.2.3. Manual de Procedimentos do Laboratório

3.2.3.1. O manual de procedimentos do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética é o documento que detalha as atividades, em todos os seus níveis de execução, de forma apropriada para o correto entendimento dos colaboradores. A documentação acima citada pode ser estabelecida na forma de um manual ou de procedimentos dentro do sistema de gestão da qualidade.

3.2.3.2. O RT deve assegurar que todos os procedimentos descritos sejam compreendidos e seguidos pela equipe do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética.

3.2.3.3. Instruções de uso do fabricante, livros-texto, artigos, manuais e outras referências bibliográficas podem ser utilizados como complemento, mas não como substituto para os procedimentos.

3.2.3.4. Os procedimentos devem definir detalhadamente todas as informações referentes a:

- a) Coleta, identificação, transporte, armazenamento, preservação, requisição e descarte de amostras biológicas;
- b) Identificação de substâncias interferentes e de limitações da amostra;
- c) Critérios de rejeição de amostras;
- d) Preparo de soluções, controles, reagentes, corantes, calibradores e outros materiais utilizados na realização dos exames;
- e) Calibração e procedimentos de verificação de calibração de equipamentos;
- f) Passo a passo dos métodos utilizados para realização dos exames;
- g) Análise e interpretação dos resultados;
- h) Controle de qualidade para cada tipo de exame;
- i) Critérios de rejeição dos resultados;
- j) Ações corretivas quando os resultados dos controles e ou das calibrações não estão de acordo com os critérios aceitáveis;
- k) Emissão e liberação de laudos.

3.2.3.5. O Manual de Procedimentos deve conter:

- a) Lista de todos os tipos de exames realizados;
- b) As condutas perante as não conformidades;
- c) As normas de biossegurança, tais como condutas de segurança biológica, química, física, ocupacional e ambiental, instruções de uso para os equipamentos de proteção individual (EPI) e coletiva (EPC), procedimentos em caso de acidentes no manuseio/transporte de amostra biológica;

- d) Sugestão: revisões anuais assinadas e datadas pelo RT.

3.2.4. Cumprimento Legal

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estar em conformidade com todas as exigências estabelecidas pelas leis federais, estaduais e municipais vigentes, suas atualizações ou outro instrumento legal que vier a substituí-las, entre elas:

- a) Programa de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA), conforme norma regulamentadora NR 09 publicada em 29 de dezembro de 1994 pela Portaria 25 da Secretaria de Segurança e Saúde do Trabalho (SSST-25) do Ministério do Trabalho;
- b) Segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde, conforme NR 32 e Portaria MTE 1748 de 30 de agosto de 2011, que estabelece diretrizes básicas para implementação de medidas de proteção à segurança e à saúde dos trabalhadores dos serviços de saúde;
- c) Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), conforme norma regulamentadora NR 07 publicada em 29 de dezembro de 1994 pela Portaria 24 da Secretaria de Segurança e Saúde do Trabalho (SSST-24) do Ministério do Trabalho;
- d) Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA publicada em 21 de fevereiro de 2002 (RDC 50) e suas alterações (RDC 189 e RDC 307), que dispõe sobre a regulamentação técnica para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde;
- e) Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, publicada em 1º de dezembro de 2009 (RDC 61), que dispõe sobre a regulamentação técnica para o funcionamento dos Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética com atividades para fins de transplantes;
- f) Portaria Consolidada nº 4 de 28 de setembro de 2017, que dispõe sobre a regulamentação técnica do Sistema Nacional de Transplantes (SNT), Anexo 9 do Anexo I dos Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética (página 82/168);
- g) Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA, publicada em 07 de dezembro de 2004 (RDC 306), que dispõe sobre Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS).

3.2.5. Controle de Documentos

Os documentos requeridos pelo sistema de gestão da qualidade devem ser controlados.

Um procedimento documentado deve ser estabelecido para definir os controles necessários para:

- a) Aprovar documentos quanto a sua adequação, antes de sua emissão;
- b) Analisar criticamente e atualizar, quando necessário, e reaprovar documentos. Nenhum documento deve ser modificado sem autorização prévia do responsável técnico;
- c) Assegurar que as alterações e a situação da revisão atual dos documentos sejam identificadas;

- d) Assegurar que as versões pertinentes de documentos aplicáveis estejam disponíveis nos locais de uso;
- e) Assegurar que os documentos permaneçam legíveis e prontamente identificáveis;
- f) Assegurar que documentos de origem externa sejam identificados e que sua distribuição seja controlada;
- g) Evitar o uso não intencional de documentos obsoletos e aplicar identificação adequada nos casos em que forem retidos por qualquer propósito;
- h) Os documentos devem ser revisados anualmente.

3.2.6. Controle de Registros

Registros devem ser estabelecidos e mantidos para prover evidências da conformidade com requisitos e da operação eficaz do sistema de gestão da qualidade, bem como para possibilitar o rastreamento de informações para investigação de qualquer suspeita de desvio da qualidade. Registros devem ser mantidos legíveis, prontamente identificáveis e recuperáveis. Um procedimento documentado deve ser estabelecido para definir os controles necessários para identificação, armazenamento, proteção, recuperação, tempo de retenção e descarte dos registros.

Alterações feitas em registros devem ser assinadas e datadas pelo Responsável Técnico ou pessoa por ele designada, possibilitando a sua leitura original e, conforme o caso, ser registrado o motivo de tais alterações.

Nota: Os dados podem ser registrados pelo sistema de processamento eletrônico de dados ou por meios fotográficos ou outras formas confiáveis, em conformidade com a legislação em vigor.

4. Responsabilidade da Direção

4.1. Comprometimento da Direção

O RT deve fornecer evidência do seu comprometimento com o desenvolvimento e a implementação do sistema de gestão da qualidade e com a melhoria da sua eficácia:

- a) Prevendo e provendo recursos financeiros, humanos e materiais necessários ao funcionamento do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- b) Garantindo condições para o cumprimento das atribuições gerais de todos os envolvidos, visando prioritariamente qualidade, eficácia e segurança;
- c) Gerenciando aspectos técnico-administrativos das atividades executadas;
- d) Zelando pelo cumprimento das diretrizes de qualidade estabelecidas nesta norma;
- e) Assegurando a atualização dos conhecimentos técnico-científicos relacionados às atividades do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;

- f) Garantindo a qualidade dos procedimentos;
- g) Estabelecendo a política e os objetivos da qualidade;
- h) Favorecendo e incentivando programas de educação continuada para todos os envolvidos nas atividades realizadas no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- i) Conduzindo as análises críticas pela direção.

4.2. Política da Qualidade

O RT deve assegurar que a política da qualidade:

- a) Seja apropriada ao propósito do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- b) Inclua um comprometimento com o atendimento aos requisitos e com a melhoria contínua da eficácia do sistema de gestão da qualidade;
- c) Proporcione uma estrutura para estabelecimento e análise crítica dos objetivos da qualidade;
- d) Seja comunicada e entendida por toda organização;
- e) Seja analisada criticamente para manutenção de sua adequação.

4.3. Objetivos da Qualidade

4.3.1. O RT deve assegurar que os objetivos da qualidade, incluindo aqueles necessários para atender aos requisitos do produto/serviço, sejam estabelecidos nas funções e nos níveis pertinentes da organização. Os objetivos da qualidade devem ser mensuráveis e coerentes com a política da qualidade.

4.3.2. O RT deve assegurar que seja implementado um sistema de medição dos indicadores definidos e que haja acompanhamento da sua evolução, para verificar o atendimento dos objetivos da qualidade.

4.4. Responsabilidade e Autoridade

O RT deve assegurar que as responsabilidades e autoridades sejam definidas, comunicadas e compreendidas pelos profissionais envolvidos nas atividades do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética.

4.5. Estrutura Organizacional

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve:

- a) Ter um organograma que demonstre sua estrutura organizacional com equipe de profissionais adequada para garantir que o produto/serviço por ele realizado esteja de acordo com os requisitos desta norma;
- b) Contar com pessoal qualificado e em quantidade suficiente para o desempenho de todas as atividades;

- c) Contar com profissional capacitado para as atividades de controle de qualidade.

4.5.1. Responsável Técnico

O Responsável Técnico é o responsável pela supervisão das atividades executadas, devendo possuir conhecimentos científicos na área de histocompatibilidade. São inerentes a este profissional as seguintes atribuições:

- a) Ser responsável por todas as operações e administração do laboratório, que dispõe sobre o recrutamento de funcionários competentes para a execução, análise, interpretação e envio de resultados com acurácia e proficiência e em tempo hábil, além de assegurar que todas as atividades e os serviços prestados estejam em conformidade com os critérios estabelecidos no laboratório e dentro dos regulamentos aplicáveis;
- b) Assegurar a qualidade dos testes de histocompatibilidade nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica;
- c) Assegurar que as instalações físicas e as condições ambientais do laboratório sejam apropriadas para os tipos de testes realizados e proporcionem um ambiente seguro no qual os funcionários estejam protegidos de riscos físicos, químicos e biológicos;
- d) Assegurar que os métodos selecionados para a realização dos testes de histocompatibilidade sejam capazes de fornecer com qualidade os tipos de resultados necessários para o uso clínico e possibilitem, desse modo, o atendimento de excelência ao receptor de órgãos sólidos ou de células-tronco hematopoéticas;
- e) Estabelecer procedimentos de controle e de garantia da qualidade que permitam a identificação e a correção de erros assegurando a qualidade dos serviços prestados;
- f) Assegurar que a equipe técnica siga os procedimentos operacionais e as instruções escritas estabelecidas no laboratório de modo a garantir a acurácia e confiabilidade dos resultados;
- g) Assegurar que o laboratório participe de teste (s) de proficiência (s) e estabelecer um plano de ações corretivas se os relatórios de desempenho mostrarem resultados não satisfatórios;
- h) Assegurar que ações corretivas sejam empregadas e documentadas sempre que houver qualquer tipo de ocorrência no laboratório;
- i) Disponibilizar consulta aos clientes do laboratório com respeito à qualidade e aos tipos de testes realizados, os tipos de testes que devem ser solicitados para atender às necessidades clínicas, bem como a interpretação dos resultados nas condições específicas de cada receptor de órgãos sólidos ou de células-tronco hematopoéticas;
- j) Estabelecer procedimentos para monitorar os indivíduos que realizam as etapas pré-analíticas, analíticas e pós-analíticas dos testes a fim de assegurar que estejam executando com competência as suas atividades, e quando necessário identificar necessidades de reforço no treinamento e (ou) na educação continuada;

- k) Assegurar que sejam documentados as qualificações e os treinamentos dos funcionários para as funções exercidas;
- l) Assegurar a existência de um manual de procedimentos sempre atualizado e a sua disponibilidade para todos os funcionários;
- m) Designar e documentar as responsabilidades e os deveres de cada membro da equipe identificando os procedimentos que cada indivíduo está autorizado a executar. Designar os membros da equipe que estão capacitados para liberar resultados de testes realizados na sua ausência;
- n) Assegurar que cada membro da equipe técnica tenha acesso à educação continuada relevante para sua área de atividade na histocompatibilidade e imunogenética;
- o) Assegurar que os laudos dos testes de histocompatibilidade incluam todas as informações pertinentes para a interpretação correta dos resultados.

4.5.2. Supervisor Técnico/Responsável Técnico Substituto (Opcional)

São inerentes a este profissional as seguintes atribuições:

- a) Assessorar o RT no controle das atividades técnico-científicas do laboratório;
- b) Assessorar o RT na seleção dos métodos apropriados para cada tipo de teste realizado no laboratório;
- c) Verificar os procedimentos dos testes realizados no laboratório e estabelecer as características de desempenho incluindo a precisão e a acurácia de cada teste;
- d) Analisar os relatórios dos testes de proficiência (s), assegurar que todos os membros da equipe tomem conhecimento dos resultados e que ações corretivas sejam realizadas quando pertinente;
- e) Monitorar para que todas as ações pertinentes aos programas de controle e de garantia da qualidade estabelecidas pelo laboratório sejam executadas;
- f) Assessorar a equipe do laboratório na resolução de problemas técnicos e solicitar parecer do RT quando necessário;
- g) Na ocorrência de problemas técnicos, assegurar que os laudos não sejam emitidos até as ações corretivas serem executadas e o sistema estiver funcionando apropriadamente;
- h) Assegurar treinamento de cada membro da equipe para o tipo e complexidade de procedimentos realizados, e identificar a necessidade de reforço de treinamento e (ou) de educação continuada;
- i) Assessorar o RT na avaliação e documentação da competência de toda a equipe técnica;
- j) Preparar laudos com os resultados dos testes e enviá-los com a aprovação do RT do laboratório. O RT pode autorizar o supervisor a enviar laudos na sua ausência.

4.5.3. Representante da Direção

O RT deve indicar um membro do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética que, independente de outras responsabilidades, deve ter responsabilidade e autoridade para:

- a) Assegurar que os processos necessários para o sistema de gestão da qualidade sejam estabelecidos, implementados e mantidos;
- b) Relatar ao RT o desempenho do sistema de gestão da qualidade e qualquer necessidade de melhoria;
- c) Assegurar a promoção da conscientização sobre os requisitos do cliente em toda a organização.

4.5.4. Equipe Técnica

4.5.4.1. Os membros da equipe técnica são responsáveis pelo processamento das amostras, pela realização dos testes de histocompatibilidade e imunogenética e pelo relato dos resultados dos testes.

4.5.4.2. Cada indivíduo realiza somente os testes, ou etapas destes testes, para os quais estão autorizados pelo RT. As atividades são autorizadas de acordo com a formação e o treinamento.

4.5.4.3. Todos os membros da equipe técnica devem:

- a) Seguir os procedimentos operacionais padronizados pelo laboratório para o manuseio e processamento de amostras, execução dos testes de histocompatibilidade e imunogenética, análise, interpretação, registros e relatos de resultados;
- b) Manter registros que demonstrem que as amostras dos testes de proficiência são testadas do mesmo modo que as amostras dos receptores;
- c) Aderir às políticas de controle e garantia da qualidade estabelecidas pelo laboratório, e documentar todas as atividades realizadas que estão relacionadas ao programa da qualidade;
- d) Ser treinados de acordo com as funções exercidas e setores em que participam (apresentar evidências dos treinamentos);
- e) Seguir as políticas e os procedimentos estabelecidos sempre que os sistemas dos testes não estejam dentro dos níveis aceitáveis de desempenho determinados pelo laboratório;
- f) Demonstrar capacidade de identificar problemas que podem ter efeitos adversos no desempenho dos testes ou no relato dos resultados, e de corrigir os problemas ou notificar imediatamente o supervisor e na sua ausência notificar o RT;
- g) Documentar todas as ações corretivas tomadas quando os sistemas de testes se desviam das especificações de desempenho estabelecidas pelo laboratório;
- h) Documentar as ações corretivas tomadas quando houver qualquer tipo de erro técnico;

- i) Na ocorrência de qualquer problema técnico, consultar o supervisor ou o RT, os quais devem estar acessíveis em tempo integral (pessoalmente, por telefone ou por comunicação eletrônica) enquanto testes de alta complexidade estão sendo realizados;
- j) Se testes de histocompatibilidade para transplante de órgãos de doador falecido são realizados pelo laboratório, deverá haver uma escala da equipe técnica para disponibilizar atendimento 24 horas por dia durante os 7 (sete) dias da semana.

4.6. Análise Crítica pela Direção

4.6.1. Generalidades

O RT deve analisar criticamente o sistema de gestão da qualidade do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética, semestralmente, para assegurar sua contínua pertinência, adequação e eficácia. Essa análise crítica deve incluir a avaliação de oportunidades para melhorias e necessidade de mudanças no sistema de gestão da qualidade, incluindo a política da qualidade e os objetivos da qualidade. Devem ser mantidos registros das análises críticas pelo RT.

4.6.2. Entradas para a Análise Crítica

As entradas para a análise crítica pela direção devem incluir:

- a) Resultados de auditorias;
- b) Análise dos resultados dos testes de proficiência;
- c) Número de exames realizados;
- d) Avaliação dos serviços do laboratório pelos clientes;
- e) Situação das ações corretivas e preventivas;
- f) Acompanhamento das ações oriundas de análises críticas anteriores;
- g) Mudanças que possam afetar o sistema de gestão da qualidade;
- h) Recomendações para melhoria;
- i) Necessidade de recursos de infraestrutura, ambiente de trabalho ou humanos.

5. Gestão de Recursos

5.1. Provisão de Recursos

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve determinar e prover recursos necessários para implementar e manter o sistema de gestão da qualidade e melhorar continuamente sua eficácia.

5.2. Recursos Humanos

5.2.1. Exigências

5.2.1.1. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve possuir um organograma funcional com a sua respectiva equipe.

5.2.1.2. RT e RT Substituto (opcional), devem ter as seguintes qualificações

Graduação em medicina, farmácia e bioquímica, biomedicina ou biologia;

- a) Título de especialista em histocompatibilidade emitido pela ABH e (ou) ASHI e (ou) EFI;
- b) Treinamento pelo período mínimo de três anos em um Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética, nacional ou internacional, que esteja estabelecido há, no mínimo, 10 (dez) anos, com RT titulado pela ABH e (ou) ASHI e (ou) EFI e credenciado pelo MS (quando se tratar de laboratório nacional);
- c) Educação continuada anual comprovada por meio de participação em congressos, simpósios, cursos e (ou) reunião local, regional, nacional e (ou) internacional na área de histocompatibilidade.

5.2.1.3. Supervisor Técnico, deve ter as seguintes qualificações

- a) Graduação em medicina, farmácia e bioquímica, biomedicina ou biologia;
- b) Treinamento e experiência em todos os métodos e tipos de testes de histocompatibilidade que estão sob sua responsabilidade de modo que possa exercer a supervisão da equipe técnica e das atividades por eles realizadas;
- c) Educação continuada anual comprovada por meio de participação em congressos, simpósios, cursos e (ou) reunião local, regional, nacional e (ou) internacional na área de histocompatibilidade.

5.2.1.4. Equipe Técnica de Nível Superior, deve ter as seguintes qualificações

- a) Graduação em medicina, farmácia e bioquímica, biomedicina ou biologia;
- b) Evidências dos treinamentos internos ou externos das rotinas laboratoriais que executa;
- c) Educação continuada anual comprovada por meio de participação em congressos, simpósios, cursos e (ou) reunião local, regional, nacional e (ou) internacional na área de histocompatibilidade.

5.2.1.5. Equipe Técnica de Nível Médio (opcional), deve ter as seguintes qualificações

- a) Formação no ensino médio;

- b) Formação em Curso de Técnico em Laboratório de Análises Clínicas ou Curso de Técnico em Patologia Clínica;
- c) Evidências dos treinamentos internos ou externos das rotinas laboratoriais que executa.

5.2.1.6. Outros Profissionais

Recursos humanos, tais como administradores, secretárias, serventes e outros, com qualificação adequada e número suficiente para assegurar a excelência dos serviços prestados pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética.

5.2.2. Conscientização e Treinamento

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve:

- a) Estabelecer e escrever os critérios e procedimentos para avaliar e documentar a competência técnica da equipe;
- b) Documentar o desempenho dos funcionários responsáveis pelos testes de amostras dos pacientes pelo menos semestralmente durante o 1º ano, ao menos anualmente após o 1º ano e sempre que a metodologia ou equipamentos mudarem.

A avaliação de competência técnica do funcionário deve incluir:

- Observações do desempenho nas rotinas considerando desde o preparo de amostra, processamento e técnica realizada.
 - Monitoramento da interpretação e liberação dos resultados dos testes.
 - Revisão de registros de controle de qualidade, resultados de testes de proficiência e registros de manutenção preventiva
 - Observação sobre controle de manutenção de instrumento e verificações de funções.
 - Avaliação do desempenho através de amostras de teste cego interno ou amostras de teste de proficiência externas.
 - Avaliação das habilidades de resolução de problemas
- c) Pelo menos uma vez por ano, cada funcionário deve testar uma amostra “cega” para cada tipo de técnica que ele realizar. O laboratório deve manter registros desses resultados para cada funcionário por um período mínimo de dois anos.
 - d) Determinar e fornecer treinamento ao pessoal que executa trabalhos que afetam a qualidade do, incluindo instruções de higiene relevantes às suas atividades, além de motivação para a manutenção dos padrões de qualidade;
 - e) Assegurar que o pessoal esteja consciente quanto ao conceito de garantia da qualidade e à pertinência e importância de suas atividades e de como elas contribuem para atingir os objetivos da qualidade;
 - f) Manter registros apropriados dos treinamentos realizados.

5.2.3. Saúde, Higiene, Vestuário e Conduta

- a) A admissão dos funcionários deve ser precedida de exames médicos, sendo obrigatória a realização de avaliações médicas periódicas dos funcionários, atendendo ao Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional - PCMSO;
- b) Em caso de suspeita ou confirmação de enfermidade ou lesão exposta, o funcionário deve ser afastado temporária ou definitivamente de suas atividades;
- c) Todos os funcionários devem ser orientados quanto às práticas de higiene pessoal. Visitantes e pessoas não treinadas não devem ter acesso às áreas controladas. Sendo necessário, essas pessoas devem ser antecipadamente informadas sobre a conduta, higiene pessoal e uso de vestimentas protetoras e devem ser acompanhadas por pessoal autorizado;
- d) Todos os funcionários devem ser instruídos e incentivados a reportar aos seus superiores imediatos quaisquer condições de risco relativas ao produto, ambiente, equipamento ou pessoal.

5.3. Infraestrutura e Ambiente de Trabalho

5.3.1. Instalações

5.3.1.1. As instalações do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética, conforme as leis federais, estaduais e municipais supracitadas, devem ser construídas de forma a permitir:

- a) Fluxo adequado dos materiais, amostras biológicas e dos profissionais;
- b) Armazenagem de registros de exames de receptores/doadores e de registros de procedimentos de controle e garantia da qualidade pelo prazo mínimo de cinco anos para receptores e até a idade máxima em que se permita a doação de medula óssea para os doadores voluntários. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética poderá armazenar todos os registros com tempo superior a 2 (dois) anos fora de suas instalações, desde que o sistema de rastreabilidade permaneça garantido. As terceirizações de armazenamento de registros devem ser formalizadas por contrato de terceirização com o prestador do serviço;
- c) Espaço para freezers e refrigeradores que armazenam reagentes e amostras biológicas;
- d) Espaço para equipamentos e bancadas de trabalho necessárias à execução dos métodos utilizados;
- e) Ventilação e iluminação adequadas;
- f) Fornecimento ininterrupto de energia para equipamentos de uso essencial, principalmente os utilizados para armazenamento de reagentes e amostras biológicas utilizados nos testes para seleção de receptores de órgãos de doador falecido.

5.3.1.2. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve possuir um memorial descritivo ou preferencialmente uma planta da área física que identifique cada sala, bem como a localização das bancadas de trabalho e seus respectivos equipamentos. Este memorial ou planta deve ser atualizado sempre que houver inserção ou mudanças estruturais e (ou) de equipamentos.

5.3.1.3. Se o Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética fizer parte de estabelecimento assistencial de saúde poderá utilizar a infraestrutura geral do serviço onde estiver instalado, tais como copa, lavanderia, higienização e esterilização de materiais, almoxarifado, coleta de amostras biológicas, coleta de resíduos, sala de utilidades, gerador de energia e outros serviços de apoio. Se as atividades de apoio não forem executadas diretamente pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética ou pelo estabelecimento assistencial de saúde devem ser formalizadas por contrato de terceirização com o prestador do serviço.

5.3.1.4. Requisitos para funcionamento de Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética baseiam-se na barreira física para separação das áreas pré e pós-PCR com o objetivo de evitar contaminação com ácidos nucleicos. Os requisitos mínimos são os seguintes:

- a) Sala para procedimentos de pré-PCR (ausência de material amplificado) composta por área de paramentação, área de extração de DNA, área de preparo da reação de PCR e área para armazenamento de amostras de DNA não amplificado;
- b) Sala para procedimentos de pós-PCR (presença de material amplificado) composta por área de paramentação; área para execução das etapas de amplificação (termocicladores) e pós-PCR de acordo com os métodos utilizados e área para armazenamento de DNA amplificado;
- c) O setor de Sorologia pode estar instalado em sala exclusiva ou na sala pré-PCR ou na sala pós-PCR. Quando não houver setor exclusivo, se possível, dar preferência para sua instalação dentro da área pré-PCR;
- d) Preparo de reagentes e de soluções pode estar instalado em sala exclusiva ou na sala pré-PCR ou ainda na Sorologia quando esta não for compartilhada com a sala de pós-PCR;
- e) Dispor de refrigeradores e freezers específicos para armazenamento de amostras e refrigeradores e freezers específicos para armazenamento de reagentes. Quando isso não for possível, o refrigerador ou freezer deve ser organizado em prateleiras/gavetas exclusivas para amostras e prateleiras/gavetas exclusivas para reagentes;
- f) Os refrigeradores e freezers para armazenamento de amostras e reagentes utilizados nos procedimentos pré-PCR podem estar em sala exclusiva ou na sala pré-PCR ou ainda na sorologia quando esta não for compartilhada com a sala pós-PCR. E os refrigeradores e freezers para armazenamento de amostras amplificadas e reagentes utilizados nos procedimentos pós-PCR devem estar na (s) sala (s) de procedimentos pós-PCR;

- g) Todos os equipamentos, materiais e reagentes utilizados na sala de pós-PCR devem ser de uso exclusivo dela e não podem ser introduzidos e nem circular na sala de pré-PCR e tampouco nos demais ambientes do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética. Do mesmo modo, todos os equipamentos, materiais e reagentes utilizados na sala de Pré-PCR devem ser de uso exclusivo dela;
- h) Estabelecer um plano sistemático de limpeza da área física e dos equipamentos. Manter procedimentos escritos sobre estas condutas e manter registros que permitam monitorar a execução das mesmas e tomar providências ante as não conformidades;
- i) Estabelecer um plano de descarte de resíduos em conformidade com o Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS) vigente.

5.3.2. Equipamentos e Instrumentos - Manutenção, Calibração e Verificação da Calibração

5.3.2.1. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve dispor de equipamentos e instrumentos de acordo com a complexidade dos serviços prestados e necessários ao atendimento da sua demanda.

5.3.2.2. Equipamentos e instrumentos utilizados, nacionais e importados, devem estar regularizados junto à ANVISA/MS, de acordo com a legislação vigente.

5.3.2.3. Aquisição, manutenção e utilização de todos os equipamentos e instrumentos devem estar incluídas no sistema de gestão da qualidade, sendo os dois últimos de acordo com as orientações do fabricante. As planilhas de controle dessas rotinas devem estar disponíveis para consulta.

5.3.2.4. Os registros das manutenções preventivas e corretivas devem ser realizados e mantidos de acordo com instruções do fabricante.

5.3.2.5. Os instrumentos que medem a temperatura, o tempo e o volume devem ser calibrados ou ter verificação de sua calibração por meio de um instrumento calibrado com o seu respectivo certificado, a intervalos regulares, de acordo com o seu uso, mantendo os respectivos registros. Os equipamentos de medição devem ser calibrados a intervalos especificados contra padrões de medição rastreáveis a padrões de medição internacionais ou nacionais - Rede Brasileira de Calibração (RBC) do INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia Normalização e Qualidade).

5.3.2.6. Os equipamentos e instrumentos devem ser verificados ou calibrados em intervalos regulares de acordo com instruções do fabricante, e estas ações devem ser documentadas.

5.3.2.7. Os equipamentos que necessitam funcionar com temperatura controlada devem possuir registro diário de verificação da temperatura. O laboratório deve estabelecer os limites de variação aceitáveis para essas variações de temperatura.

5.3.2.8. O laboratório deve tomar providências sempre que os limites aceitáveis de variação da temperatura dos equipamentos, refrigeradores e congeladores forem ultrapassados, inclusive a avaliação da integridade dos materiais neles armazenados.

5.3.2.9. A temperatura de banhos-maria, estufas, blocos térmicos, componentes dos equipamentos automatizados deve ser verificada e registrada diariamente ou antes do uso.

5.3.2.10. O laboratório deve ter uma lista dos equipamentos em uso incluindo os equipamentos de terceiros que lhe são confiados, independente de haver contrato comercial entre as partes. Os equipamentos devem estar identificados com uma etiqueta afixada em local visível, e esta deve conter, no mínimo, as seguintes informações:

- a) Data da última verificação/calibração, quando pertinente;
- b) Data da próxima verificação/calibração ou a periodicidade;
- c) Equipamentos fora de uso ou sem condições de uso devem ser identificados como tal.

5.3.2.11. O laboratório deve ter para todos os equipamentos e instrumentos as seguintes instruções escritas:

- a) Funcionamento;
- b) Verificação da calibração, quando pertinente;
- c) Limpeza e manutenção;
- d) Possíveis causas de mau funcionamento e respectivas ações corretivas;
- e) Controle de temperaturas dos equipamentos, refrigeradores e freezers, mantendo registro das medições realizadas.

Observação: Os itens a, b, c e d podem ser substituídos pelo manual do fabricante ou do fornecedor, desde que escrito na língua portuguesa.

5.3.2.12. Todos os fornecedores de serviços de verificação da calibração ou de manutenção de equipamento devem ser qualificados para os serviços ofertados. Devem, ainda, estabelecer a periodicidade da manutenção preventiva e corretiva de cada equipamento e documentar os serviços realizados.

5.3.2.13. A calibração de todos os equipamentos utilizados para mensurações quantitativas deve ser realizada e documentada. Estes procedimentos de calibração devem:

- a) Seguir as instruções do fabricante do sistema de teste (kits), quando fornecidas;

- b) Usar materiais de calibração fornecidos ou indicados como adequados para o teste e, se possível, com base em um método ou material de referência de valor conhecido;
- c) Ser realizados com, no mínimo, a frequência recomendada pelo fabricante;
- d) Utilizar os critérios verificados ou estabelecidos pelo laboratório durante a validação;
- e) Incluir número, tipo e concentração de materiais de calibração, bem como os limites aceitáveis para calibração e frequência da calibração, conforme estabelecido pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- f) Repetir obrigatoriamente a calibração e a documentação se a verificação não estiver dentro dos limites aceitáveis.

5.3.2.14. Para dispensadores volumétricos, como seringas tipo Hamilton, que não podem ser calibrados, verificar e documentar os volumes dispensados, de acordo com o procedimento, a cada 6 (seis) meses.

5.3.2.15. Para termocicladores, as temperaturas alvo apropriadas devem ser alcançadas. A exatidão dessas temperaturas deve ser verificada e documentada pelo menos a cada 12 (doze) meses.

5.3.2.16. Para citômetros de fluxo e analisadores de fluxo para uso exclusivo com microesferas (Luminex), os procedimentos de padronização e calibração devem seguir as seguintes orientações, conforme aplicável:

- a) Incluir um padrão óptico composto de esferas de látex ou outras partículas uniformes, para garantir a focalização e o alinhamento apropriados de todas as lentes em ambos os caminhos da fonte de luz excitadora e dos detectores de sinal (por exemplo, dispersão da luz e fluorescência);
- b) Incluir um padrão fluorescente para cada fluorocromo a fim de garantir a detecção adequada do sinal fluorescente. Esses padrões fluorescentes podem ser incorporados nas esferas ou em outras partículas usadas para padronização óptica ou pode ser uma esfera separada ou uma preparação de células fixadas;
- c) Correr ambos os padrões óticos e fluorescentes no mínimo uma vez por semana, ou de acordo com o recomendado pelo fabricante, e também sempre que ocorrer manutenção, ajustes ou problemas que possam afetar o bom funcionamento do equipamento;
- d) Registrar e monitorar os resultados de focalização óptica e do alinhamento dentro da periodicidade estabelecida pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- e) Estabelecer os limites aceitáveis dos valores de resultados da padronização óptica e fluorescente para todos os sinais relevantes de cada instrumento utilizado. O Laboratório de

Histocompatibilidade e Imunogenética deve ter um procedimento escrito detalhando a ação corretiva a ser tomada quando um valor específico não for alcançado;

- f) Registrar a potência do laser (miliWatts) e a entrada da corrente elétrica (Amperagem) a cada dia de uso. Os limites aceitáveis e os protocolos de ação corretiva devem ser documentados.

5.3.2.17. Para leitora de ELISA, os procedimentos de padronização e calibração devem seguir as seguintes orientações:

- a) Demonstrar que a fonte de luz e o filtro da leitora de placa produzem a intensidade e o comprimento de onda de luz necessários para o sistema de teste;
- b) Realizar e documentar calibração, verificação do alinhamento da placa, movimento e linearidade do equipamento conforme instruções do fabricante pelo menos uma vez a cada seis meses;
- c) Verificar e documentar o desempenho da lavadora de microplacas uma vez por mês.

5.3.3. Computadores e Programas (Softwares)

5.3.3.1. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve ter quantidade suficiente de equipamentos de informática para o bom desempenho da logística interna. Esses equipamentos devem ter manutenção periódica e registros dos serviços e atualizações realizados.

5.3.3.2. O laboratório deve ter um termo de compromisso, redigido em linguagem clara e acessível, que deve ser assinado por todo prestador de serviços de informática, assegurando a confidencialidade, a fidedignidade, o controle e monitoramento e o rastreamento dos dados.

5.3.3.3. Os programas de computador e as respectivas versões atualizadas que sejam utilizadas para análise devem ser validados quanto à exatidão e precisão do resultado obtido no teste, e esta validação deve ser documentada antes da liberação de resultados. O laboratório pode atender a este requisito realizando análise paralela, de uma bateria de exames, usando o programa antigo e o novo ou utilizando a versão antiga e a nova do mesmo programa.

5.3.3.4. Os programas de computador utilizados na operacionalização do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética devem ter controle de versão vigente e seus conteúdos apresentarem sistemática de *backup* ou cópia periódica interna e externa, prezando o armazenamento dos dados.

6. Requisitos Técnicos

6.1. Teste de Proficiência Externo da ABH

6.1.1. Regras para participação no Teste de Proficiência Externo da ABH

6.1.1.1. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve participar do teste de proficiência externo da ABH em todos os métodos utilizados na rotina do laboratório (tipificação HLA Baixa/Média e (ou) Alta Resolução, Prova Cruzada de Linfócitos e (ou) Pesquisa de Anticorpos anti-HLA).

6.1.1.2. Os procedimentos (reagentes e estratégias) empregados na realização dos testes de proficiência devem ser os mesmos utilizados pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética para as amostras de rotina dos receptores e doadores.

6.1.1.3. O laboratório que realizar tipificação HLA de alta resolução deve participar do teste de proficiência externo de alta resolução oferecido pela ABH.

6.1.1.4. Não é permitida a comunicação a respeito de resultados de testes de proficiência entre os laboratórios participantes antes de o prazo final para envio dos resultados ter expirado. Esta determinação se aplica também aos RTs de 2 (dois) ou mais laboratórios.

6.1.1.5. Não é permitido aos Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética participantes de testes de proficiência fornecer as amostras a outros laboratórios.

6.1.1.6. Devem ser documentadas e arquivadas no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética, pelo prazo mínimo de dois anos, todas as etapas referentes aos exames realizados com amostras dos testes de proficiência. A documentação inclui: relatórios emitidos pelas entidades provedoras de testes de proficiência com os resultados/consenso dos laboratórios participantes; formulários usados pelo laboratório para registrar o desempenho nos testes de proficiência assinados e para comprovar a revisão pelo RT seguida de providências relacionadas às ações corretivas quando pertinente.

6.1.2. Avaliação do desempenho no Teste de Proficiência Externo da ABH

6.1.2.1. Tipificação HLA de Baixa/Média Resolução

Desempenho satisfatório requer o atendimento às regras vigentes estabelecidas pela Comissão do Controle de Qualidade da ABH ou as atualizações que venham a substituí-las.

6.1.2.2. Tipificação HLA de Alta Resolução

Desempenho satisfatório requer o atendimento às regras vigentes estabelecidas pela Comissão do Controle de Qualidade da ABH ou as atualizações que venham a substituí-las.

6.1.2.3. Prova Cruzada de Linfócitos

Desempenho satisfatório requer o atendimento às regras vigentes estabelecidas pela Comissão do Controle de Qualidade da ABH ou as atualizações que venham a substituí-las.

6.1.2.4. PRA e Identificação de Anticorpos anti-HLA

Desempenho satisfatório requer o atendimento às regras vigentes estabelecidas pela Comissão do Controle de Qualidade da ABH ou as atualizações que venham a substituí-las.

6.1.3. Desempenho Insatisfatório no Teste de Proficiência Externo da ABH

6.1.3.2. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve:

- a) Identificar e documentar a causa de cada resultado insatisfatório;
- b) Prosseguir imediatamente com ações corretivas para evitar a recorrência do problema e impedir que erros detectados por meio dos testes de proficiência resultem na liberação de resultados incorretos em amostras de receptores e doadores;
- c) O laboratório que tiver desempenho insatisfatório na tipificação HLA deverá solicitar à ABH remessa de 15 (quinze) amostras de referência no prazo de 30 (trinta) dias após o recebimento do relatório com os resultados do teste de proficiência. Os resultados desta bateria de 15 (quinze) amostras devem ser enviados no prazo máximo de 30 (trinta) dias após o recebimento das amostras. Se os resultados da nova bateria de amostras forem insatisfatórios, a ABH suspenderá o selo de qualidade e notificará ao SNT. Para readquirir a acreditação da ABH, o laboratório deverá tomar medidas corretivas eficientes e solicitar nova auditoria.

6.1.4. Avaliação Interna do Desempenho nos Testes de Proficiência

6.1.4.1. O RT do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve revisar e avaliar os resultados obtidos nos testes de proficiência, e de preferência dentro do prazo de um mês após o recebimento dos relatórios enviados pelas entidades provedoras para que possam ser aplicadas ações corretivas quando pertinente.

6.1.4.2. Toda a equipe do laboratório deve ser informada sobre o desempenho nos testes de proficiência após a avaliação de cada relatório.

6.1.4.3. A avaliação dos testes de proficiência deve ser documentada e arquivada no laboratório.

6.2. Sistemas de Fase Pré-Analítica

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve monitorar e avaliar a qualidade dos sistemas pré-analíticos, e quando necessário corrigir os problemas identificados.

6.2.1. Requisição do Exame

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve realizar os exames somente mediante requisição médica eletrônica ou escrita. E a requisição deve conter, no mínimo, as seguintes informações:

- a) Nome completo e contato (fone, e-mail ou endereço) do solicitante;
- b) Nome ou número de identificação único do receptor ou doador, CPF, sexo e idade ou data de nascimento;
- c) Data da solicitação;
- d) Especificação do exame solicitado;
- e) O tipo de amostra biológica a ser coletada, quando pertinente;
- f) Sempre que possível, informações relevantes para a interpretação e relato de resultados, tais como número de transfusões, gestações ou transplante prévio e terapia imunossupressora.

6.2.2. Coleta do Material Biológico (amostras)

6.2.2.1. Todos os materiais utilizados na coleta devem ser estéreis, apirogênicos e descartáveis.

6.2.2.2. As amostras biológicas de receptores e doadores, exceto os linfonodos e baço, podem ser coletadas pelo próprio Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética ou coletadas e encaminhadas ao laboratório por:

- a) Equipes de retirada de órgãos e tecidos autorizadas pela CGSNT;
- b) Centros transplantadores de órgãos, tecidos e células progenitoras hematopoéticas autorizados pela CGSNT;
- c) Hemocentros e (ou) hemonúcleos, para fins de inscrição de doadores no REDOME;
- d) Outros laboratórios ou estabelecimentos de saúde licenciados pelo órgão de vigilância sanitária competente.

6.2.2.3. Os linfonodos e os fragmentos de baço provenientes de doador falecido e necessários às provas cruzadas pré-transplante de órgãos devem ser coletados e encaminhados ao Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética exclusivamente pelas equipes de retirada de órgãos e tecidos que são autorizadas pela CGSNT.

6.2.2.4. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer e disponibilizar instruções escritas, em linguagem acessível, sobre os seguintes procedimentos:

- a) Coleta: tipo e quantidade de amostra, tipos de tubos/frascos e ou anticoagulantes, quantidade da amostra;

- b) Identificação do tubo/frasco: nome do receptor/doador ou número de identificação único e a data da coleta;
- c) Condições para acondicionamento e transporte: o transporte de amostras biológicas deve obedecer aos prazos, às condições de temperatura e aos padrões técnicos visando à integridade e estabilidade da amostra, além de garantir a segurança do pessoal e do ambiente;
- d) Critérios de aceitação e rejeição de amostras;
- e) A realização de exames em amostras com restrições deve estar definida pelo laboratório.

6.2.3. Recepção e Cadastro das Amostras Biológicas no Laboratório

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve conferir a requisição, as condições de embalagem, a integridade e a identificação das amostras, além de registrar a entrada das amostras, com identificação que permita a sua rastreabilidade, bem como registrar o nome do funcionário que as recebeu.

No registro dos receptores e doadores para transplante de órgãos, tecidos e células progenitoras hematopoéticas, recomenda-se conter, no mínimo, as seguintes informações:

- a) Número de registro de identificação do receptor ou doador gerado pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- b) Número de registro de identificação do receptor ou doador (RGCT) gerado pela CNCDO, quando aplicável;
- c) Nome do receptor ou doador;
- d) O número do documento que comprove a identidade;
- e) Grau de parentesco com o receptor, quando da identificação de doador aparentado;
- f) Data de nascimento, sexo e procedência (serviço de saúde);
- g) Raça/cor (de acordo com a classificação do IBGE);
- h) Telefone e endereço, quando aplicável;
- i) Nome e contato do responsável legal em caso de doador menor de idade ou incapacitado, nos casos de doação de células progenitoras hematopoéticas, e de receptor menor de idade ou incapacitado;
- j) Nome do serviço solicitante do exame com identificação do responsável pela solicitação;
- k) Tipo de exame solicitado e finalidade;
- l) Tipo de amostra coletada;
- m) Data e local da coleta;
- n) Data de recebimento das amostras, quando não coletadas pelo próprio Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;

- o) Informações do receptor, complementares à realização do exame, quando aplicável: tipo de diálise realizada; histórico de transfusão de sangue e hemocomponentes, de transplante prévio e de gestação.

6.2.4. Envio de Amostras para Laboratório Terceirizado

Se exames de histocompatibilidade, imunogenética e ou imunologia dos transplantes são terceirizados, estes devem ser encaminhados para laboratório certificado pela ABH e (ou) ASHI e (ou) EFI, sendo necessário um contrato de prestação de serviços entre as partes.

6.3. Sistemas de Fase Analítica

6.3.1. Manuseio, Processamento e Armazenamento das Amostras

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer e seguir políticas e procedimentos escritos para:

- a) Identificação e rastreamento confiáveis das amostras durante todo o processo de realização dos exames até a emissão e o envio de resultados;
- b) Manuseio e armazenamento das amostras sob condições que mantenham a integridade delas para a obtenção de resultados confiáveis;
- c) Sistema de armazenamento que permita resgatar amostras de modo fácil e em tempo hábil sempre que necessário.

6.3.2. Monitoração de Ambientes

6.3.2.1. O laboratório deve estabelecer um sistema de controle de temperatura ambiente que garanta as temperaturas adequadas ao bom funcionamento dos equipamentos e à execução dos procedimentos técnicos. Deve manter procedimentos escritos que estipulem o monitoramento da temperatura ambiente e as faixas de variação permitidas, registrar e resumir os resultados desta monitoração, bem como das ações para corrigir as não conformidades.

6.3.2.2. O laboratório deve estabelecer um sistema de controle da temperatura de freezers, refrigeradores e incubadoras. Deve manter procedimentos escritos que estipulem o monitoramento da temperatura e as faixas de variação permitidas, registros e resumo dos resultados desta monitoração, bem como das ações para corrigir as não conformidades. As temperaturas abaixo mencionadas devem ser monitoradas e documentadas em cada turno de trabalho:

- a) Incubadora e banho-maria;
- b) Temperatura ambiente;

- c) Refrigeradores e freezers;
- d) Estabelecer um plano de emergência para armazenar reagentes críticos e amostras de receptores candidatos a transplante.

6.3.2.3. O nível de nitrogênio líquido deve ser monitorado em intervalos que assegurem o suprimento adequado constantemente.

6.3.3. Reagentes

6.3.3.1. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deverá definir, monitorar e documentar as condições para estocagem de reagentes em conformidade com as instruções e recomendações do fabricante, incluindo os seguintes itens:

- a) Tipo de água utilizada;
- b) Qualidade da água;
- c) Temperatura de armazenagem;
- d) Umidade;
- e) Rótulo.

6.3.3.2. Todos os reagentes químicos, soluções, solventes, meios de cultivo, padrões para calibração e sais, bem como todas suas alíquotas, utilizados no laboratório devem ser etiquetados apropriadamente e guardados de acordo com sua especificidade.

6.3.3.3. Todos os frascos contendo soluções ou reagentes, bem como todas suas alíquotas, devem ser rotulados com o nome do produto, titulação (quando aplicável), concentração, a data de aquisição ou preparação, validade e responsável pelo preparo da solução.

6.3.3.4. Não é permitida a utilização de reagentes químicos, soluções, solventes, meios de cultivo padrões para calibração, sais e outros suprimentos, sejam eles comerciais ou caseiros, que estejam aquém dos padrões de qualidade, que tenham deteriorado ou cujo prazo de validade tenha expirado.

6.3.3.5. Reagentes enviados pelo fabricante sem data de validade deverão ser submetidos a validações internas periódicas para assegurar desempenho ótimo do produto.

6.3.3.6. As prateleiras para estoque devem ser apropriadas para conter os frascos de reagentes e serem feitas de material resistente aos produtos químicos a serem guardados. Bandejas de plástico resistentes podem ser utilizadas para estocar reagentes que possuam propriedades químicas especiais.

6.3.3.7. Deve-se manter um controle de estoque de almoxarifado. As condições dos materiais estocados devem ser verificadas anualmente. Materiais que não estejam mais sendo utilizados devem ser descartados o mais rápido possível. Não se devem estocar reagentes químicos diretamente sob a luz solar ou próximo a fontes de calor.

6.3.3.8. Deve-se estabelecer um sistema de controle para identificação de lote e de despachos dos reagentes utilizados em cada teste.

6.3.3.9. Todo novo lote ou novo despacho, mesmo que do mesmo lote, deverá ser previamente validado antes de ser liberado para uso em laboratório clínico.

6.3.3.10. O uso de kits comerciais requer que sejam seguidas rigorosamente as instruções do fabricante. Em caso de utilizar outro protocolo, o laboratório deve fazer validação interna e registrar os resultados para provar que as modificações introduzidas garantem os mesmos resultados obtidos por meio do protocolo recomendado pelo fabricante.

6.3.3.11. Quando forem utilizados soros reagentes caseiros, o Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve:

- a) Ter registro de todos os soros com as seguintes informações: fonte de obtenção (doador), data da coleta, número de identificação, especificidade e volume atualizado;
- b) Validar a especificidade de soros reagentes obtidos localmente utilizando células controle apropriadas ou métodos de fase sólida. A validação deve ser concluída e documentada antes de os soros serem liberados para uso em laboratório clínico;
- c) O painel de controle usado para validação da especificidade dos soros locais tem que incluir células que expressem o antígeno específico, células que não expressem o referido antígeno e células que contenham antígenos que apresentem reatividade cruzada com o anticorpo em teste;
- d) Após a validação dos soros locais, controles subsequentes podem ser feitos por meio de testes em paralelo com o lote anterior;
- e) O laboratório tem de assegurar que os meios de cultivo estão estéreis e que garantem o crescimento, se usado para cultura de células.

6.3.4. Métodos de validação de testes

6.3.4.1. Todos os novos procedimentos e as modificações nos procedimentos já existentes precisam ser validados no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética.

6.3.4.2. O sistema de validação estabelecido e os resultados obtidos devem ser registrados e analisados.

6.3.4.3. O laboratório que introduzir um novo teste comercial, sem modificá-lo, deve validar o desempenho do teste. Se introduzir um novo teste comercial e fizer modificações nele, deve comprovar as seguintes características: precisão, exatidão e a não alteração do desempenho do teste.

6.4. Métodos e aplicação

6.4.1. Instruções gerais

6.4.1.1. Os procedimentos dos métodos selecionados pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética devem ser realizados de acordo com as instruções de uso do fabricante (comercial) ou conforme modificado (comercial) e validado pelo laboratório ou ainda conforme o procedimento desenvolvido e validado pelo laboratório quando se tratar de método caseiro.

6.4.1.2. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve dispor de estratégia alternativa para resolver resultados ambíguos ou inconclusivos pelo método principal. No caso de não dispor de método adicional de tipificação, é necessário fazer um contrato com um laboratório acreditado pela ABH para encaminhar amostras com resultados inconclusivos.

6.4.1.3. Fazer duas análises e duas interpretações independentes dos dados das Tipificações HLA, da Prova Cruzada de Linfócitos, do PRA e Identificação de Anticorpos anti-HLA.

6.4.1.4. Estabelecer critérios de aceitação ou de rejeição de resultados para cada método utilizado no laboratório. A aceitação de resultados fora dos critérios estabelecidos deve ser justificada e documentada.

6.4.2. Métodos

6.4.2.1. Métodos para Tipificação HLA

6.4.2.1.1. Microlinfocitotoxicidade

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que realizam testes de microlinfocitotoxicidade devem:

- a) Empregar um método para preparação da suspensão celular que forneça células em número suficiente e com pureza, e viabilidade que assegure a acurácia dos resultados;
- b) Assegurar que os reagentes de tipificação tenham especificidade apropriada e que o complemento tenha reatividade adequada;
- c) Documentar que a viabilidade celular no controle negativo é suficiente para assegurar a acurácia da interpretação dos resultados;

- d) Registrar os resultados utilizando um sistema de escores que indique a porcentagem aproximada de células mortas.

6.4.2.1.2. Métodos moleculares

Os laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que utilizam métodos moleculares para a tipificação HLA devem:

- a) Definir o tipo e a quantidade mínima aceitável das amostras em termos de volume e (ou) de número de células nucleadas para cada tipo de exame;
- b) Utilizar um método de isolamento (extração) que forneça concentração e pureza de DNA que assegure a obtenção de resultados confiáveis;
- c) Assegurar que as amostras de DNA sejam armazenadas em condições que preservem a sua integridade e em áreas livres de contaminação;
- d) Assegurar que os reagentes utilizados para amplificação primária sejam armazenados em áreas pré-PCR e nunca sejam expostos em áreas pós-PCR;
- e) Assegurar que as sondas e os primers de oligonucleotídeos sejam armazenados sob condições que mantenham sua integridade;
- f) Reconhecer e documentar combinações ambíguas de alelos obtidas para cada amostra frente a primers e (ou) sonda incluídos no método utilizado, e dispor de procedimentos/estratégias para resolvê-las dentro dos critérios relevantes para uso clínico.

6.4.2.1.2.1. Método de SSO reverso baseado em tecnologia Luminex

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que realizam tipificação HLA por PCR-SSOr devem:

- a) Deve-se estabelecer os limites aceitáveis de contagem de microesferas e da intensidade de fluorescência (MFIs) para resultados positivos e negativos a fim de assegurar a interpretação correta dos resultados;
- b) Estabelecer e cumprir a periodicidade de atualização dos códigos do NMDP;
- c) Interpretar os dados utilizando o banco de dados do IMGT/HLA ou outro banco de dados de sequências de nucleotídeos adequado desde que estes sejam atualizados a cada 6 (seis) meses. Deve-se documentar nos registros do laboratório qual a versão da biblioteca que foi utilizada para a interpretação dos alelos.

6.4.2.1.2.2. Método de PCR-SSP ou outro para os quais tamanho do fragmento de DNA amplificado for um fator crítico na análise dos dados

- a) Recomenda-se incluir, em cada gel, marcadores de peso molecular cujos tamanhos abranjam toda a faixa de tamanhos de fragmentos contemplados pelo teste;

- b) A quantidade de DNA adicionada em cada cavidade do gel deve estar dentro da faixa que assegure a migração equivalente de DNA em todas as amostras, incluindo a quantidade dos marcadores de peso molecular.

6.4.2.1.2.3. Método de Sanger para sequenciamento do DNA

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que realizam tipificação HLA por método de Sanger devem:

- a) Assegurar que os templates de sequenciamento sejam gerados com comprimento apropriados, livres de inibidores e livres de contaminantes capazes de causar artefatos de sequenciamento (por exemplo, primers residuais)
- b) Assegurar que as regiões das sequências que correspondem aos primers de amplificação não sejam consideradas na designação dos alelos
- c) Recomenda-se o sequenciamento das duas fitas (sense e antissense). Se a rotina do laboratório se baseia na sequência de somente uma fita, a confirmação periódica da fita complementar é recomendada. Porém, se a sequência sugerir um novo alelo ou uma combinação rara de alelos, deve-se determinar a sequência de ambas as fitas;
- d) Estabelecer critérios para aceitação e interpretação dos dados, por exemplo, intensidade de sinal, forma dos picos, relação ruído/sinal (*N/S*);
- e) Interpretar os dados utilizando o banco de dados do IMGT/HLA ou outro banco de dados de sequências de nucleotídeos adequado desde que estes sejam atualizados no mínimo a cada 6 (seis) meses. Deve-se documentar nos registros do laboratório qual a versão da biblioteca que foi utilizada para a interpretação dos alelos.

6.4.2.1.2.4. Método de Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que realizam tipificação HLA por método de NGS devem:

- a) Definir a região genômica a ser caracterizada (gene inteiro ou parte de gene HLA, KIR, etc). Certificar-se de que o método de enriquecimento da região alvo seja confiável gerando modelos de sequências de tamanho apropriado.
Deve-se estabelecer o tamanho das regiões-alvo desejadas (gene inteiro ou segmentos), a pureza do alvo após o enriquecimento e a variação alélica presente na população. Deve-se contemplar ampla diversidade de variantes alélicas de cada locus testado para avaliar possíveis drop-outs, ou seja, ineficiência na amplificação e identificação de alelos. Alelos com fraca representação nos dados de sequenciamento (drop-out) devem ser direcionados para método alternativo;

- b) Documentar e validar o processo de preparo da amostra enriquecida para sequenciamento, incluindo o cumprimento das especificações relevantes do fornecedor. O processo de preparação da biblioteca de DNA para seqüenciamento pode variar dependendo do método de enriquecimento de alvo e da plataforma de seqüenciamento.
- Deve-se estabelecer procedimentos para avaliar o impacto de seqüências dos barcodes sobre a eficiência do método do enriquecimento, quando o barcode fizer parte de um primer. Se os barcodes forem incorporados após o enriquecimento do alvo, a fidelidade desse processo para identificar uma determinada amostra precisa ser monitorada (por exemplo: promover rotatividade das amostras de controle com diferentes barcodes).
- Os laboratórios devem estabelecer procedimentos para identificar ineficiência na amplificação de alelos (drop-outs) e amplificações preferenciais e, se necessário, ajustar o programa de software para detectar níveis de amplificação preferencial;
- c) Documentar a química do seqüenciamento, reagentes, chips e células de fluxo usadas para cada corrida de sequenciamento, incluindo parâmetros de execução e configuração de leitura (por exemplo: bidirecional, pairendend / single-end ou mate-pair). Deve ser documentado o comprimento de leitura esperado, dependendo do chip particular ou do tamanho de fragmentos de DNA selecionado durante o preparo da biblioteca.
- Laboratórios que desejam executar genotipagem HLA e não-HLA devem validar e documentar profundidade de cobertura para cada um dos ensaios executados simultaneamente.
- Os laboratórios devem utilizar amostras de controle para monitorar o desempenho do instrumento de sequenciamento ao longo do tempo;
- d) Definir e documentar critérios de desempenho analítico aceitáveis para as corridas do sequenciamento:
- Qualidade da base por posição de leitura
 - Cobertura média
 - Média de comprimento de leitura
 - Uniformidade de cobertura ao longo da região alvo
- Incorporar especificações de fornecedores e dados de validação gerados por laboratório. As medidas de desempenho dos instrumentos devem incluir dados do controle interno e/ou material de controle de qualidade fornecido pelo fornecedor;
- e) Documentar o processo de informática usado na geração e análise de arquivos de dados de seqüenciamento (por exemplo: FASTQ, BAM), incluindo como as leituras de seqüências são agrupadas pelo barcode, como os adaptadores e os iniciadores de amplificação são cortados, e como os critérios de qualidade são usados para filtrar ou excluir as leituras de seqüências. Em cada etapa, as aplicações individuais e as versões de software devem ser validados e documentados. Além disso, os métodos pelos quais os dados são transferidos entre cada etapa

do processo de informática deve ser documentado. Quaisquer scripts ou configurações que se desviem do padrão apresentado pelo fornecedor devem ser identificadas e validadas.

Os laboratórios devem estabelecer procedimentos para identificar limitações do programa de análise. O software de genotipagem deve fornecer todos as métricas de qualidade necessárias (por exemplo: profundidade de cobertura, score de qualidade para a base lida e alinhamento das sequencias). O laboratório deve determinar os valores aceitáveis para cada métrica de qualidade afim de assegurar um resultado exato;

- f) Criar uma política de armazenamento e transmissão de dados - arquivos de sequenciamento primário, intermediário e final. Os dados guardados devem permitir a reanálise do arquivo do sequenciamento quando necessário.

Os laboratórios devem estabelecer políticas para armazenar arquivos não alinhados de sequenciamento processados (por exemplo, FASTQ);

- g) Documentar e validar alterações em qualquer etapa do processo de NGS. Modificações ou atualizações para o pipeline da informática também devem ser validadas reanalisando o conjunto de dados previamente sequenciados.

Validação de software para a análise de NGS pode ser realizada usando conjuntos de dados de seqüência existentes. Para genotipagem HLA a validação deve incluir alelos representativos da população cujas frequências acumuladas permitam cobertura de 85-95% da população;

- h) Deve-se validar de forma independente softwares usados para genotipagem a partir de dados de sequenciamento NGS. Certificar-se de que os algoritmos de genotipagem são apropriados para a estratégia de sequenciamento usada e modalidades de erro apresentados pelas diferentes tipos de química de seqüenciamento (por exemplo: erros de homopolímero).

Identificar limitações do programa de análise. O software de genotipagem deve fornecer todos as métricas de qualidade necessárias (profundidade de cobertura, score de qualidade para a base lida e alinhamento das sequencias) cujos os valores aceitáveis devem estar determinados pelo laboratório.

Deve-se criar procedimento para monitorar qualquer etapa do teste NGS que seja encaminhado para outro laboratório. Os laboratórios que encaminharem qualquer etapa do processo NGS a um laboratório de referência são responsáveis por garantir que o laboratório de referência seja credenciado para executar as etapas relevantes do teste.

Deve-se criar procedimento para rastrear as amostras e seus dados quando qualquer etapa do teste NGS for encaminhada a outro laboratório. Esse procedimento deve abordar métodos e registros para confirmação da identidade da amostra e dos dados.

6.4.2.2. Laboratórios que realizam Tipificação HLA devem

- a) Assegurar que o nível de resolução da tipificação HLA seja apropriado para a aplicação clínica e seja baseado em critérios estabelecidos;
- b) Nas tipificações HLA de baixa/média resolução é obrigatório resolver as ambiguidades de 2 (dois) ou mais fenótipos possíveis;
- c) Quando indicada uma tipificação de alta resolução:
 1. Um resultado pode fornecer um ou mais fenótipos (ambiguidades) desde que os alelos envolvidos apresentem as mesmas sequências de nucleotídeos ou que codifiquem as mesmas sequências de aminoácidos nos exons 2 e 3 dos genes HLA-A, B, C e no exon 2 dos genes HLA-DRB1, DQA1, DQB1 e DPB1;
 2. As ambiguidades que envolvem alelos cujas diferenças estão localizadas fora dos exons 2 e 3 para genes de classe I e fora do exon 2 para genes de classe II, mas que afetam sua expressão [alelos nulos (N) ou de baixa expressão (L)] devem ser resolvidas quando se tratar de um dos seguintes alelos nulos classificados como intermediário ou bem documentados na lista de alelos **CIWD Version 3.0.0** (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tan.13811>)

3.0.0 CIWD					
A*01:04N	A*24:36N	B*07:67N	C*02:38N	DRB1*07:10N	DPB1*61:01N
A*01:15N	A*24:84N	B*07:181N	C*02:92N	DRB1*07:26N	DPB1*64:01N
A*01:16N	A*24:90N	B*14:07N	C*04:09N	DRB1*12:24N	DPB1*120:01N
A*01:57N	A*24:252N	B*15:01:01:02N	C*04:93N		DPB1*154:01N
A*01:123N	A*25:12N	B*15:79N	C*04:95N	DRB4*01:03N	DPB1*161:01N
A*02:53N	A*30:70N	B*15:181N	C*05:07N	DRB4*01:16N	DPB1*218:01N
A*02:83N	A*30:78N	B*15:190N	C*05:99N	DRB4*02:01N	DPB1*357:01N
A*02:94N	A*31:14N	B*35:165N	C*06:16N	DRB4*03:01N	DPB1*570:01N
A*02:113N	A*31:60N	B*37:03N	C*06:79N	DRB5*01:08N	
A*02:125N	A*32:27N	B*37:42N	C*07:32N	DRB5*01:10N	
A*02:227N	A*32:45N	B*39:40N	C*07:33N		
A*02:514N	A*34:10N	B*40:22N	C*07:55N	DQB1*02:18N	
A*03:21N	A*68:18N	B*40:142N	C*07:61N	DQB1*02:20N	
A*11:21N		B*40:155N	C*07:104N	DQB1*03:118N	
A*11:109N		B*44:23N	C*07:198N	DQB1*06:26N	
A*23:11N		B*51:11N	C*07:227N	DQB1*06:75N	
A*23:19N			C*07:452N	DQB1*06:77N	
A*24:09N			C*08:127N	DQB1*06:144N	
A*24:11N			C*15:122N		
			C*16:30N		

3. Um resultado com dois ou mais fenótipos deve ser resolvido sempre que o(s) fenótipo(s) alternativo(s) for(em) constituído(s) por pelo menos um alelo comum ou um alelo intermediário. Um resultado cujo(s) fenótipo(s) alternativo(s) for(em) constituído(s) de dois alelos raros (**não CIWD**) não precisa de estratégias adicionais para resolvê-los.
- d) Deve-se determinar e documentar por escrito os critérios e protocolos para:
1. O preparo de células, subpopulações celulares ou de isolamento de componentes celulares (por exemplo, DNA) apropriados para as técnicas de tipificação HLA utilizadas no laboratório;
 2. A seleção, o controle de qualidade e a utilização de todos os reagentes e demais componentes necessários às técnicas de tipificação HLA utilizadas no laboratório.
- e) Quando for possível a identificação dos haplótipos parentais, recomenda-se que estes sejam especificados no laudo. A ocorrência de haplótipos recombinantes também deve ser comentada no laudo. A identidade genotípica entre irmãos só pode ser comprovada se a tipificação HLA de ambos os pais for conhecida ou se a segregação dos quatro haplótipos estiver claramente definida na família;
- f) Utilizar a terminologia de antígenos e alelos HLA em conformidade com a determinação vigente do Comitê para Nomenclatura HLA da Organização Mundial de Saúde.

6.4.2.3. Métodos para Prova Cruzada

6.4.2.3.1. Os laboratórios que realizam Prova Cruzada por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) devem

- a) Empregar um método para preparação da suspensão celular que forneça células em número suficiente e com pureza, e viabilidade que assegure a acurácia dos resultados;
- b) Estabelecer procedimentos para o preparo das células ou isolamento de componentes celulares do doador;
- c) Testar cada novo lote ou novo despacho do mesmo lote de complemento, por meio de titulação, para determinar que esteja exercendo a citotoxicidade na presença de anticorpo específico e que não cause citotoxicidade inespecífica;
- d) Testar o complemento, na titulação adequada, separadamente com cada tipo de célula-alvo (por exemplo, células T e B) e com cada variante de método de microlinfocitotoxicidade utilizado. A otimização do desempenho do complemento pode diferir para cada alvo ou método;
- e) Armazenar o estoque e as alíquotas de complemento à temperatura mínima de -70°C ;
- f) Testar cada novo lote ou novo despacho do mesmo lote de AGH, por meio de titulação, e realizar a retitulação em períodos pré-determinados para avaliar se a mesma continua com a reatividade adequada;

- g) Testar cada preparo de DTT, utilizando um soro controle de diluição, um soro controle positivo para IgG e para IgM e um soro controle negativo;
- h) Incluir um controle negativo e um controle positivo em cada placa de cada teste de microinfocitotoxicidade;
- i) Usar um controle positivo a uma diluição adequada para o método, isto é, com um título em que pequena mudança na sensibilidade do método tenha possibilidade de ser detectada;
- j) Quando realizar testes com população enriquecida de linfócitos B, incluir um controle positivo para linfócitos T (controle de contaminação) e para linfócitos B (controle de pureza);
- k) Documentar que a viabilidade celular no controle negativo é suficiente para assegurar a acurácia da interpretação dos resultados;
- l) Estabelecer critérios para seleção adequada das amostras de soro do receptor;
- m) Registrar os resultados de cada combinação soro/célula utilizando um sistema de escores que indique a porcentagem aproximada de células mortas;
- n) Testar o soro do receptor sob as seguintes condições: puro e com as diluições estabelecidas pelo procedimento do laboratório, e tratado e não tratado com DTT;
- o) Assegurar o rastreamento da amostra de soro a partir de sua coleta até a liberação do resultado;
- p) Para o transplante de órgãos sólidos, usar uma técnica que detecta anticorpos contra os antígenos HLA que tenha sensibilidade superior à da técnica básica de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), por exemplo, a prova cruzada NIH-AGH para células T;
- q) Estabelecer um processo apropriado para distinguir os anticorpos contra os antígenos HLA de classes I e II dos anticorpos não-HLA que seja adequado para as aplicações clínicas;
- r) Utilizar um método que detecte anticorpos contra antígenos HLA de classe II e os distinga dos anticorpos contra os antígenos HLA classe I, quando aplicável;
- s) Adotar protocolos que visem diminuir a reação cruzada de possíveis anticorpos terapêuticos nos testes realizados;

6.4.2.3.2. Os laboratórios que realizam Prova Cruzada por citometria de fluxo devem:

- a) Estabelecer protocolo definindo períodos de tempo aceitáveis entre o processamento, a marcação e a aquisição de dados (leitura). As amostras de controles devem ser tratadas da mesma forma;
- b) Diferenciar subpopulações de mononucleares (células T, células B) mediante o uso de anticorpos monoclonais capazes de detectar marcadores CD específicos, e que estes monoclonais estejam marcados com fluorocromos diferentes do empregado para revelar a presença de anticorpos do receptor na membrana da célula;

- c) Estabelecer protocolo definindo um limiar para discriminar reações positivas independente do método empregado para a apresentação de resultados (média, mediana, desvios de canal ou medida quantitativa de fluorescência). Qualquer alteração significativa no protocolo, nos reagentes ou nos instrumentos exige a repetição da determinação do limiar de discriminação de reações positivas;
- d) Usar diluições e ou volume de reagentes anteriormente testados e validados no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- e) Anticorpos ou outros reagentes liofilizados devem ser tratados para a remoção de microagregados antes do uso, de acordo com as instruções da bula do fabricante ou segundo um protocolo definido pelo laboratório;
- f) Verificar a ligação de imunoglobulina humana usando um reagente marcado com fluorocromo. Pode ser um F(ab')₂ anti-IgG humana específico para a região Fc da cadeia pesada ou outro método documentado descrito;
- g) Usar os reagentes anti-imunoglobulina humana sempre de acordo com as instruções do fabricante, ou em titulação que demonstre a melhor sensibilidade (razão sinal/ruído). Caso mais de uma cor esteja sendo usada, certificar-se de que o instrumento esteja adequadamente compensado e de que a interferência entre os fluorocromos seja mínima;
- h) Documentar a titulação da imunoglobulina;
- i) Estabelecer protocolo para documentar o uso de todos os controles e suas periodicidades.

6.4.2.3.3. Os laboratórios que realizam Prova Cruzada Virtual devem:

Redigir acordo com cada serviço de transplante atendido onde deverão constar os critérios e procedimentos a serem adotados em avaliação prospectiva da realização de provas cruzadas virtuais. O acordo deve incluir:

- Obrigatoriedade da solicitação da informação dos eventos de sensibilização
- Periodicidade da coleta de soro e ensaios de fase sólida
- Descrição e justificativa dos valores de corte para interpretação dos anticorpos na prova cruzada virtual
- Estratégia para tipificação adicional do doador (ex: DQA1 ou DPA1) quando houver necessidade em função da presença de anticorpos específicos
- A prova cruzada física deverá ser realizada por CDC ou citometria de fluxo além da prova cruzada virtual

- a) Os pacientes candidatos a um transplante de órgãos deverão estar tipificados para HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQ e DP por método molecular que permita interpretação segura da prova cruzada virtual.
- b) Os doadores de órgão, falecido ou vivo, deverão ser tipificados, inicialmente, para HLA-A, B, C, DRB1/3/4/5, DQB1 e DPB1 por método molecular que permita interpretação segura da prova cruzada virtual.
- c) Caso sejam detectados anticorpos no soro do receptor contra DQA1 e/ou DPA1, o doador deverá ser tipificado para esses loci;
- d) O estudo dos soros dos candidatos a um transplante deverá contar uma amostra atual com menos de 60 dias e deverá cobrir no mínimo 4 amostras de soro, que correspondam aos últimos 12 meses ou no caso de receptores sensibilizados ou hipersensibilizados, além da amostra de soro recente as 3 mais representativas da sensibilização. Quando detectados anticorpos anti-HLA, estes devem ser caracterizados a nível alélico, e seus grupos de reação cruzada devem ser considerados para o aceite do órgão;
- e) Quando um candidato ao transplante for priorizado para o recebimento do órgão e não houver soro suficiente que corresponda ao período de 12 meses, neste caso a prova cruzada virtual poderá ocorrer, mas a prova cruzada física quer por CDC ou citometria de fluxo não será dispensada;
- f) Sobre o quantitativo de amostras que devem ser testadas, o mesmo deve corresponder a no mínimo 4 amostras de soro coletadas nos últimos 12 meses. As mesmas devem ter um intervalo de no máximo 90 dias e, na ocorrência de eventos de sensibilização, um novo teste deve ser realizado, com nova coleta de soro, com no mínimo 20 dias após o evento, independente da data do teste anterior. A caracterização dos anticorpos é obrigatória para as amostras de soro reagentes. Os alelos contra os quais foram determinados anticorpos devem ser listados, bem como, seus grupos de reação cruzada virtual;

Em situações excepcionais em que somente a prova cruzada virtual for realizada, os termos deverão ser acordados entre o centro de transplante e laboratório de histocompatibilidade. A realização SOMENTE da Prova Cruzada Virtual deverá ter o aval final da Central de Transplantes da localidade e do Sistema Nacional de Transplantes. O Centro de Transplante e Laboratório de Histocompatibilidade deverão justificar essa escolha e em quais situações ocorrerá a dispensa da prova cruzada física.

6.4.2.4. Métodos para pesquisa de anticorpos

6.4.2.4.1. Laboratórios que realizam pesquisa de anticorpos anti-HLA por citotoxicidade dependente de complemento (CDC) devem:

- a) Utilizar um painel de antígenos suficiente em número e distribuição fenotípica com respeito aos antígenos individuais e Grupos de Reatividade Cruzada (CREGs = *Cross-Reactive Groups*) de acordo com o objetivo da utilização dos resultados do teste e adequado para a população atendida pelo laboratório;
- b) Documentar os fenótipos HLA de classe I e ou de classe II do painel para os testes que se destinam a fornecer informações sobre a especificidade do anticorpo anti-HLA;
- c) Documentar que o *pool* de células ou de antígenos utilizados para indicar a presença ou ausência (teste de triagem) de anticorpos anti-HLA inclui as principais especificidades antigênicas ou CREGs, ou que as células/antígenos HLA deste *pool* sejam derivadas de uma população de tamanho suficiente para assegurar a representação das principais especificidades HLA de classes I e II da população da região atendida no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- d) Quando a nomenclatura CREG for utilizada, documentar os antígenos definidos por cada CREG;
- e) Estabelecer um procedimento que permita detectar a ligação não específica de anticorpos;
- f) Utilizar um método de triagem (*screening*) de anticorpos anti-HLA que seja no mínimo tão sensível quanto o método de prova cruzada utilizado na rotina do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- g) Se a avaliação da reatividade contra painel HLA for realizada por CDC com o painel do laboratório (caseiro), deve-se descrever os procedimentos para a seleção adequada de células, preparação das células e manutenção do painel. O painel caseiro deve ser constituído de no mínimo 30 linfócitos T e 30 linfócitos B tipificados para os antígenos HLA de classe I e II, respectivamente, e representativo das frequências fenotípicas HLA da população da região ou da população atendida;
- h) Estabelecer critérios para cálculo do percentual de PRA a partir da reação de anticorpos contra as células do painel HLA;
- i) Adotar protocolos que visem diminuir a reação cruzada de possíveis anticorpos terapêuticos nos testes realizados.

6.4.2.4.2. Laboratórios que realizam pesquisa de anticorpos anti-HLA por ensaio de fase sólida (ELISA/Luminex) devem

- a) Validar todos os cálculos e determinar os valores de corte (*cut off*), positivo ou negativo, para cada tipo de método utilizado;
- b) Estabelecer, verificar e seguir os critérios para garantir que um número suficiente de microesferas (*beads*) ou outros substratos, para cada especificidade, seja analisado em cada teste;
- c) Estabelecer critérios para cálculo do percentual de PRA a partir da reação de anticorpos contra antígenos HLA isolados ou painel de fenótipos aderidos a superfícies sólidas; definir a partir de qual ponto de corte as reações serão consideradas para o cálculo desse percentual;
- d) Estabelecer critérios para avaliação e aceitação dos controles positivos e negativos dos testes utilizados;
- e) Estabelecer, verificar e seguir critérios para garantir a eficácia bem como a perda de reatividade do anticorpo secundário;
- f) Adotar protocolos que visem diminuir a reação cruzada de possíveis anticorpos terapêuticos nos testes realizados.

6.5. Apoio aos Serviços de Transplante

6.5.1. Determinações Gerais aos laboratórios que realizam testes de histocompatibilidade para transplantes

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética devem definir políticas que especifiquem os testes que devem ser realizados para cada tipo de transplante (células, tecidos ou órgãos sólidos). Estas políticas devem incluir, quando aplicável:

- a) Protocolos individuais para cada tipo de transplante que sejam diferenciados pelo tipo de doador, órgão ou tecido;
- b) Protocolos para receptores com alto risco de rejeição do aloenxerto;
- c) Sensibilidade e especificidade dos testes necessários para apoiar os protocolos clínicos de transplante;
- d) Protocolos para estocagem e manutenção das amostras relevantes dos receptores candidatos a transplantes. As políticas devem definir quais amostras devem ser armazenadas e o tempo de estocagem;
- e) Protocolos para avaliar a extensão da sensibilização de cada receptor no momento de sua avaliação inicial e após potenciais eventos de sensibilização;
- f) Protocolos para obtenção e armazenamento de amostras de soro após eventos sensibilizantes;

- g) Protocolos para avaliação periódica das amostras de soro, de candidatos ao transplante, quanto à presença e especificidades dos anticorpos anti-HLA, incluindo a frequência da triagem destas amostras de soro.

Os laboratórios devem ter um acordo por escrito com cada centro de transplante atendido sobre os testes de histocompatibilidade. Os acordos devem ser revisados a cada 2 anos.

Os acordos escritos entre laboratórios de histocompatibilidade e centros de transplante devem incluir todos os seguintes:

1. Requisitos da amostra para tipificação HLA e prova cruzada;
2. Locos HLA e o nível de resolução para tipificação;
3. Fluxo para solicitar a tipificação HLA estendida;
4. Fluxo para resolver discrepâncias e erros de tipificação HLA;
5. Tempo máximo desde o recebimento da amostra até a liberação dos resultados ao centro de transplante;
6. Fluxo para obter histórico de sensibilização para cada paciente;
7. Frequência da coleta periódica de amostras;
8. Tipo de teste que será usado para a triagem de anticorpos e para a prova cruzada;
9. Protocolos para monitoramento pós dessensibilização;
10. Orientações sobre amostras para monitoramento pós-TCTH (análise de quimerismo).

6.5.2. Transplante Renal e (ou) Transplante de Pâncreas

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que realizam testes para transplante renal devem:

- a) Realizar prospectivamente a tipificação HLA-A, -B e -DR dos receptores candidatos a transplante e dos doadores. Na presença de anticorpos contra antígenos HLA-C, HLA-DQ ou HLA-DP, recomenda-se realizar as tipificações destes locos
- b) Realizar a triagem dos soros dos candidatos a transplante para a presença de anticorpos anti-HLA na avaliação inicial, periodicamente (segundo os intervalos autorizados pelas portarias do Ministério da Saúde) e após eventos sensibilizantes. Nos casos positivos é obrigatória a identificação da especificidade dos anticorpos;
- c) Realizar as provas cruzadas, T e B, prospectivamente, usando as amostras e a sensibilidade apropriadas para os protocolos clínicos estabelecidos com o centro de transplante;
- d) Protocolo para seleção dos soros para prova cruzada de receptores alosensibilizados, que contemple o impacto de eventos sensibilizantes históricos e atuais;

- e) Sempre que possível incluir uma amostra de soro obtida após evento de sensibilização na prova cruzada final se o candidato ao transplante recebeu transfusão sanguínea, teve aloenxerto rejeitado ou removido ou foi submetido a quaisquer outros eventos sensibilizantes;
- f) Recomenda-se a monitoração de anticorpos contra doador no período pós-transplante.

6.5.3. Laboratórios que Realizam Testes de Histocompatibilidade para Transplantes de Órgãos de Doadores Falecidos devem:

6.5.3.1. Definir políticas e procedimentos, estabelecidos em acordo com o programa de transplante, para o recebimento periódico de amostras de soro dos receptores candidatos ao transplante (soroteca) com a finalidade de pesquisa de anticorpos anti-HLA e da realização de provas cruzadas.

6.5.3.2. Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que apoiam programas de transplante de órgãos sólidos provenientes de doadores falecidos devem utilizar métodos para investigação de anticorpos anti-HLA que possam definir as especificidades dos anticorpos mesmo em receptores hipersensibilizados.

6.5.4. Transplantes de Outros Órgãos Sólidos

6.5.4.1. Se a prova cruzada final, exigida pelas políticas estabelecidas entre o Laboratório de Histocompatibilidade e o Serviço de Transplante, não for realizada prospectivamente deve-se documentar as circunstâncias.

6.5.4.2. Definir políticas e procedimentos, junto com o programa de transplantes, para o recebimento de amostras de soro dos receptores com a finalidade de pesquisa de anticorpos anti-HLA e da realização de provas cruzadas.

6.5.5. Transplante de Células Tronco-Hematopoéticas

Os Laboratórios de Histocompatibilidade e Imunogenética que realizam testes de histocompatibilidade para transplante de células tronco-hematopoéticas devem:

- a) Realizar tipificação HLA atendendo o nível de resolução e a inclusão dos locos exigidos pelo REDOME ou outros registros de doador voluntário de células-tronco hematopoéticas e (ou) pelo Serviço de Transplante atendido pelo laboratório;
- b) Realizar a tipificação HLA confirmatória do receptor utilizando obrigatoriamente uma nova amostra de modo que a tipificação HLA seja corroborada antes da seleção final do doador aparentado (consanguíneo) ou não aparentado;
- c) Realizar a tipificação HLA confirmatória do doador selecionado, aparentado ou não aparentado, utilizando obrigatoriamente uma nova amostra de modo que a tipificação HLA

- seja corroborada antes da coleta de células-tronco hematopoéticas. Para os doadores não aparentados, as tipificações do registro são aceitas como a primeira destas duas amostras;
- d) Realizar os testes adequados e necessários para estabelecer a identidade HLA entre o receptor e seus irmãos ou outros doadores aparentados (consanguíneos) com fenótipos HLA idênticos.
 - e) Em caso de unidades de cordão umbilical, a tipificação confirmatória é obrigatória com DNA obtido a partir de segmento do cordão umbilical. Repetir a tipificação HLA-A, B, C DRB1, DQB1 e DPB1 em alta resolução e documentar a concordância com a tipificação prévia informada para o cordão.

6.6. Sistema pós-analítico

6.6.1. Introdução

6.6.1.1. Os resultados devem ser analisados e revisados pelo RT, RT substituto ou pessoa designada.

6.6.1.2. Terceirização de exames de histocompatibilidade: o laboratório que enviar amostras de receptores / doadores para ser testada em outro laboratório deve seguir as seguintes regras:

- a) As informações transcritas do laudo do laboratório executor do exame para o seu próprio formato de laudo não podem alterar os resultados ou as informações referentes à interpretação dos resultados que são fornecidas pelo laboratório executor. Deve-se informar no laudo o nome do laboratório que realizou o exame;
- b) O laudo original enviado pelo laboratório executor do exame pode ser entregue ao cliente (paciente, médico, REDOME/REREME);
- c) O laboratório solicitante poderá permitir que o laboratório executor do exame envie o resultado do teste diretamente para o cliente, e, neste caso, o laboratório executor deve enviar uma cópia do laudo ao laboratório solicitante.

6.6.2. Laudos

Deve-se prover de um sistema dimensionado para a demanda de exames do laboratório a fim de garantir a entrega de resultados (laudos) no menor tempo possível, com acurácia, reprodutibilidade, confidencialidade e capacidade de emissão de segunda via em curto espaço de tempo.

6.6.2.1. Os Laudos de Todos os Tipos de Testes devem conter as seguintes informações:

- a) Identificação do laboratório executor do exame com endereço e telefone, os dados referentes ao requerente, ao receptor, data da coleta da amostra, entrada da amostra e emissão do resultado, assinatura pelo responsável do laboratório;
- b) Tipo de amostra biológica, por exemplo: soro, sangue periférico, sangue de cordão umbilical, swab bucal, linfonodos, baço etc.;
- c) Identificação única da amostra no laboratório com o número identificador do indivíduo testado;
- d) Os resultados dos testes realizados: Tipificação HLA, Prova Cruzada de Linfócitos, PRA ou Pesquisa de Anticorpos anti-HLA;
- e) O método/kit do teste e, quando aplicável, as unidades de medida com os valores de referência do teste;
- f) Quando aplicável, a interpretação e os comentários pertinentes aos resultados;
- g) O laboratório deve relatar no laudo quaisquer informações sobre as condições das amostras que não atendam aos critérios estabelecidos para sua aceitação.

6.6.2.2. Laudos de Tipificação HLA devem Informar:

- a) A versão do banco de dados IMGT/HLA utilizada para interpretar os resultados de tipificação HLA deve ser incluída no laudo;
- b) O relato dos alelos dos genes HLA e ou de seus produtos deve ser feito em conformidade com a terminologia oficial vigente determinada pelo Comitê de Nomenclatura HLA da OMS ([HTTP://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/](http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/));
- c) As combinações de alelos ambíguos na tipificação HLA de alta resolução;
- d) Os alelos não resolvidos na tipificação de alta resolução;
 - Os resultados de tipificação HLA poderão ser reportados usando grupo G, grupo P ou codificação NMDP;
 - No caso de resultado em grupo G ou P não é obrigatório listar os alelos não resolvidos que estão dentro do mesmo grupo G ou P;
 - Quando os resultados de tipificação HLA forem informados no laudo com os códigos do NMDP, recomenda-se que sejam acompanhados de legenda para esclarecer o grupo de alelos contemplados em cada código ou incluir o endereço para consultar os códigos (NMDP: <https://hml.nmdp.org/MacUI/>).

6.6.2.3. Laudos de PRA e de Pesquisa de Anticorpos anti-HLA devem incluir:

- a) Método utilizado para o cálculo da porcentagem do PRA;
- b) Metodologia, especificando o fabricante do reagente comercial;
- c) Se designar especificidades dos anticorpos encontrados, mencionar o valor do ponto de corte (*cut off*);
- d) Recomenda-se oferecer referência sobre a intensidade média de fluorescência dos anticorpos;
- e) É obrigatório a avaliação de anticorpo doador específico (DSA) nos casos de transplante de células-tronco hematopoiéticas e nos casos de transplante renal doador vivo.

6.6.2.4. Erros na Emissão de Laudos:

Em caso de erros, referentes aos resultados dos testes ou outros tipos de informação, identificados após a emissão de laudos, o laboratório deverá:

- a) Retificar o laudo e incluir a observação que o laudo foi retificado na data pertinente;
- b) Manter uma cópia do laudo original e do laudo retificado;
- c) Manter um comprovante de que o cliente foi notificado da retificação do laudo.

6.6.3. Liberação de Resultados

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer o plano de liberação de resultados de exames (incluindo distribuição eletrônica). Por exemplo, resultados de tipificação HLA de doadores voluntários de medula óssea (DVMO) para cadastro no REDOME devem ser fornecidos exclusivamente a este registro brasileiro; testes de histocompatibilidade solicitados por médico de receptor com indicação de transplante de medula óssea ou de órgãos sólidos devem ser fornecidos somente para pessoas autorizadas como o médico solicitante, receptor ou seus responsáveis. Laudos com resultados de mais de um indivíduo não devem ser divulgados, a menos que seja recebido consentimento de todos os indivíduos reportados no laudo.

6.6.4. Avaliação pós-analítica

É obrigação do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética estabelecer:

- a) Sistema de avaliação dos resultados dos exames que são feitos em equipamentos diferentes ou por métodos diferentes com periodicidade de 6 (seis) meses;
- b) Sistema de avaliação de laboratórios utilizados para terceirização de exames por meio de solicitação do envio anual dos resultados de teste de proficiência e de certificado de acreditação;
- c) Implantação de políticas, processos e ações documentadas para as seguintes situações: resultado de exames de rotina e de amostras de testes de proficiência que não atendem aos

padrões de aceitação estabelecidos pelo laboratório, e identificação de erros nos resultados dos exames;

- d) Medidas corretivas imediatas em situações de erro nos resultados dos exames: notificar o solicitante do exame; providenciar o envio do laudo retificado; arquivar a cópia do resultado errado e do retificado.

7. Medição, Análise e Melhoria

7.1. Generalidades

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve planejar e implementar os processos necessários de monitoramento, medição, análise e melhoria, para:

- a) Demonstrar a conformidade do produto/serviço;
- b) Assegurar a conformidade do sistema de gestão da qualidade;
- c) Melhorar continuamente a eficácia do sistema de gestão da qualidade.

7.2. Medição e monitoramento

7.2.1. Auditoria interna

7.2.1.1. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve executar auditorias internas em um ano após a acreditação/renovação da acreditação, para determinar se o sistema de gestão da qualidade:

- a) Está conforme com as disposições planejadas, com os requisitos desta Norma e com os requisitos do sistema de gestão da qualidade estabelecidos pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética;
- b) Está mantido e implementado eficazmente.

7.2.1.2. O responsável pela área a ser auditada deve assegurar que as ações sejam executadas, sem demora indevida, para eliminar não conformidades detectadas e suas causas e para o aprimoramento da qualidade dos produtos/serviços. As atividades de acompanhamento devem incluir a verificação das ações executadas e o relato dos resultados de verificação.

Recomenda-se que o Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética utilize os padrões das Listas de Verificação da ABH para a condução do seu processo interno de auditoria.

7.2.2. Reclamações

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer um plano para documentar reclamações e problemas relatados ao laboratório pelos clientes (receptores ou

responsáveis, médicos, laboratórios conveniados, REDOME e outros). As reclamações devem ser investigadas e as ações corretivas devem ser tomadas sempre que pertinentes.

7.2.3. Controle da Qualidade

O programa de controle de qualidade interno deve estabelecer procedimentos que monitorem a acurácia e precisão do processo analítico.

7.2.3.1. Controles para detecção de erros nos testes

Os procedimentos de controle devem detectar erros imediatos que ocorrem devido a falhas do sistema de teste, condições ambientais adversas e desempenho do operador.

As amostras controle devem ser analisadas da mesma forma que as amostras-teste.

Deve-se estabelecer o número, o tipo e a frequência dos controles utilizando, quando aplicável, as especificações de desempenho verificadas ou estabelecidas pelo Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética.

Os tipos de controles podem ser comerciais ou formas alternativas descritas na literatura.

Para cada teste qualitativo, deve-se incluir um controle negativo.

Um controle positivo deve ser incluído no mínimo semanalmente em cada teste qualitativo

Nos testes em que a inibição de uma reação for fonte significativa de resultados falso negativos deve-se incluir um tipo de controle capaz de detectar a inibição. Por exemplo, o uso de controles internos no método da PCR-SSP.

Nas corridas de eletroforese, recomenda-se a utilização de marcadores de peso molecular.

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve definir critérios de aceitação ou de rejeição dos resultados, de acordo com a metodologia utilizada, após avaliação dos resultados dos controles. Os resultados das análises dos controles devem ser registrados.

As ocorrências e as respectivas ações corretivas adotadas quando houver rejeições de resultados de amostras controle devem ser sempre registradas.

7.2.3.2. Controles para teste de reagentes e equipamentos

Validar o teste usando controles ou amostra com resultados conhecidos, antes de reiniciar o teste com amostras (rotina), nas seguintes situações:

- a) Novo lote de reagentes: realizar teste paralelo com o lote prévio ou utilizar controles/amostras conhecidas. O número de testes para liberar este novo lote deve ser determinado pelo RT, por exemplo: lote novo - 3 amostras, mesmo lote - 1 amostra;
- b) Novo despacho do mesmo lote de reagentes: testar pelo menos uma amostra já conhecida para demonstrar que os reagentes não foram comprometidos durante o despacho;

- c) Novo equipamento: testar amostras conhecidas e o número de testes deve ser determinado pelo RT.

7.2.3.3. Controle de DNA contaminante pelo teste do esfregaço

O teste do esfregaço de diferentes superfícies (bancadas, equipamentos, micropipetas, portas de refrigeradores, freezers e portas em geral) nas áreas pré-PCR deve ser realizado porque permite a detecção de DNA contaminante.

O número de superfícies testadas (esfregaços) e a frequência da realização do teste devem ser definidos pelo RT (por exemplo: semanal, quinzenal, mensal).

Deve-se monitorar a potencial contaminação utilizando métodos que sejam no mínimo tão sensíveis quanto os métodos de rotina e utilizando primers apropriados para detectar os produtos de amplificação produzidos com maior frequência no Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética. Incluir pelo menos um controle negativo (sem DNA) e um controle positivo em cada bateria de esfregaços a serem testados.

Recomenda-se que cada bateria de teste do esfregaço seja realizada sem adição de DNA e paralelamente com a adição de DNA para controle de inibição da PCR.

Se for detectada contaminação e ou inibição deve-se proceder à limpeza da "área contaminada" e/ou "área fonte de inibição". Após a limpeza, repetir os esfregaços das áreas comprometidas e retestá-las com a maior brevidade possível. Documentar todos os resultados e as medidas para prevenir futuras contaminações.

Toda a equipe do laboratório deve ser informada sobre o resultado do teste do esfregaço após a avaliação.

7.3. Melhorias

7.3.1. Melhoria Contínua

O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve continuamente melhorar a eficácia do sistema de gestão da qualidade por meio do uso da política da qualidade, objetivos da qualidade, resultados de auditorias e ações corretivas.

7.3.2. Ação Corretiva

7.3.2.1. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve executar ações corretivas para eliminar as causas de não conformidades, de forma a evitar sua repetição. As ações corretivas devem ser apropriadas aos efeitos das não conformidades encontradas.

Um procedimento documentado deve ser estabelecido para definir requisitos para:

- a) Análise crítica de não conformidade (incluindo reclamações de clientes);
- b) Determinação das causas de não conformidades;

- c) Avaliação da necessidade de ações para assegurar que aquelas não conformidades não ocorrerão novamente;
- d) Determinação e implementação de ações necessárias;
- e) Registro dos resultados de ações executadas;
- f) Análise crítica de ações corretivas executadas.

7.3.2.2. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética deve estabelecer políticas para esclarecer discordâncias intra ou interlaboratórios.

Devem-se estabelecer políticas e procedimentos de ações corretivas disponíveis para uso quando necessário, garantindo o funcionamento do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética para testar as amostras clínicas de forma a garantir a acurácia dos resultados, incluindo, mas não se limitando, a:

- a) Equipamentos ou metodologias que não cumprem as exigências dos parâmetros de funcionamento e especificações;
- b) Os resultados de material de controle e de calibração não atendem aos critérios de aceitabilidade do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética. Todos os exames realizados neste período têm de ser avaliados para determinar se o resultado do exame está comprometido pelo problema. O Laboratório de Histocompatibilidade e Imunogenética tem que adotar ações corretivas para assegurar acurácia no resultado do exame;
- c) O não cumprimento dos critérios para o armazenamento adequado de reagentes e amostra;
- d) Erros identificados nos testes de proficiência externo da ABH devem ser documentados, analisados e ações corretivas devem ser adotadas para prevenir recorrência;
- e) Acidentes de qualquer natureza no espaço de trabalho devem ser documentados, investigados e estabelecidas ações corretivas para prevenir a recorrência.