

UBIRAJARA COSTA FERRAZ

**TEMPO COLETA/PROCESSAMENTO E
QUALIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE
DE CORDÃO UMBILICAL**

Dissertação de Mestrado

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI

**Unicamp
2009**

UBIRAJARA COSTA FERRAZ

**TEMPO COLETA/PROCESSAMENTO E
QUALIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE
DE CORDÃO UMBILICAL**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Tocoginecologia, área de
Tocoginecologia

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO BARINI

**Unicamp
2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

F413t	<p>Ferraz, Ubirajara Costa Tempo coleta/processamento e qualidade da amostra de sangue de cordão umbilical / Ubirajara Costa Ferraz . Campinas, SP : [s.n.], 2009.</p> <p style="text-align: center;">Orientador : Ricardo Barini Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Cordão umbilical. 2. Controle de qualidade. 3. Células-tronco adultas. 4. Células-tronco. 5. Sangue fetal. I. Barini, Ricardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
-------	---

Título em inglês : Time collecting/processing and umbilical cord blood sample quality

Keywords:

- Umbilical cord
- Quality control
- Adult stem cells
- Stem cells
- Fetal blood

Titulação: Mestre em Tocoginecologia
Área de concentração: Tocoginecologia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Barini
Profa. Dra. Ângela Cristina Malheiros Luzo
Profa. Dra. Silvia Daher

Data da defesa: 19 - 02 - 2009

Diagramação e arte final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

R-7412

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: UBIRAJARA COSTA FERRAZ

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Membros:

1.

2.

3.

Ubirajara Costa Ferraz

Ricardo Barini

Azela Estua Malheus Dias

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 19/02/2009

*À Katya Barbosa de Farias
por não.
Meu respeito, minha gratidão e meu carinho*

Dedico este trabalho...

*À Katya Berbare de Farias
por tudo.
Meu respeito, minha gratidão e meu carinho*

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ricardo Barini, pela oportunidade e orientação.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Costa Paiva, pela orientação e paciência.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Cecatti, pela epidemiologia.

À Profa. Dra. Sophie Derchain, pelas dinâmicas de grupo.

Ao Prof. Dr. Luis Guillermo Bahamondes, por me fazer acreditar que era possível.

Ao Prof. Dr. Belmiro Gonçalves Pereira e ao Prof. Dr. Renato Passini Junior pelas orientações na qualificação.

A todos os demais Professores do Departamento de Tocoginecologia da Unicamp.

À Margarete, pela disponibilidade, orientações e simpatia.

Ao Vilton, pelas estatísticas, gráficos e tabelas.

Ao Prof. Dr. Gregório Lorenzo Acácio, pelo incentivo, orientação e cobrança.

À Universidade de Taubaté e ao Prof. Dr. Xenofonte P. R. Mazzini, responsável pelas Disciplinas de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade de Taubaté.

Ao Dr. Nelson Hidekazu Tatsui, Diretor da Criogênese, pelo apoio e retaguarda laboratorial.

A todos os demais amigos, pelo incentivo e apoio.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Summary	xi
1. Introdução	13
2. Objetivos	19
2.1. Objetivo geral	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. Sujeitos e Método	20
3.1. Desenho	20
3.2. Tamanho amostral.....	20
3.3. Definição de Variáveis.....	21
3.3.1. Variável independente	21
3.3.2. Variáveis dependentes.....	21
3.4. Seleção de sujeitos	22
3.4.1. Critérios de inclusão.....	22
3.4.2. Critérios de exclusão.....	23
3.5. Técnica e testes de controle de qualidade.....	23
3.5.1. Coleta do sangue de cordão umbilical	24
3.5.2. Preparo e transporte do sangue de cordão umbilical	28
3.5.3. Testes de controle de qualidade da amostra.....	29
3.6. Instrumento para coleta de dados.....	31
3.7. Coleta de dados	32
3.8. Critérios para descontinuação.....	33
3.9. Controle de Qualidade	33
3.10. Processamento e análise de dados	33
3.11. Aspectos Éticos	34
4. Publicação.....	35
5. Conclusões.....	57
6. Referências Bibliográficas.....	58

7. Anexos	62
7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	62
7.2. Anexo 2 – Ficha de registro de coleta de SCU	64
7.3. Anexo 3 – Identificação da bolsa	66
7.4. Anexo 4 – ficha de coleta de dados	67
7.5. Anexo 5 – Aprovação do Comitê de Ética da Unicamp	68
7.6. Anexo 6 – Aprovação da Comissão de Ética da FUST - Taubaté.....	70

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSCU – Banco de Sangue de Cordão Umbilical

CD34+ – Células com marcador de superfície CD34

CTA – Células-Tronco Adultas

°C – Grau(s) Celsius

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IATA – *International Air Transport Association*

μl – Microlitro(s)

ml – Mililitro(s)

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RN – Recém-Nascido

SCU – Sangue de Cordão Umbilical

Tf – Tempo final

Ti – Tempo inicial

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação do intervalo de tempo entre coleta e processamento do sangue de cordão umbilical e a qualidade da amostra. **Sujeitos e métodos:** As amostras de sangue de cordão umbilical, colhidas no terceiro período do parto, foram acondicionadas em caixas homologadas para transporte de material biológico, com monitoração da temperatura, e enviadas ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical, onde foram submetidas à contagem do número de células nucleadas, do número de células viáveis, do número de células CD 34+ e pesquisa de contaminação, nos intervalos de tempo de até 24, até 48 e até 72 horas. Os dados foram analisados pelo teste de variância para medidas repetidas MANOVA e comparados através do teste qui-quadrado de McNemar, considerando-se o nível de significância de 5%. **Resultados:** As médias e as medianas do número de células nucleadas, número de células viáveis e número de células CD34+ tiveram quedas significativas ($P < 0,0001$) com o aumento do intervalo de tempo coleta/processamento, sendo entre 24 e 48 horas menor do que a comparação entre 24 e 72 horas. Constatada correlação linear entre as médias de células viáveis e células CD34+ nos três momentos da análise. A pesquisa de contaminação foi negativa em todas as amostras. **Conclusões:** O aumento do

intervalo de tempo coleta/processamento influenciou negativamente na contagem de células nucleadas, células viáveis e CD34+ e não esteve associado à contaminação das amostras. Foi constatada correlação linear entre a queda do número de células viáveis e de células CD34+.

Palavras-chave: cordão umbilical; controle de qualidade, células-tronco adultas, células-tronco, sangue fetal.

Summary

Objective: To evaluate the association between the time interval from umbilical cord blood sampling until analysis and the quality of the sample. **Materials and methods:** Umbilical cord blood samples collected during the third stage of labor were placed in temperature-controlled boxes for the transport of biological material and sent to an umbilical cord blood bank, where the number of nucleated cells, the number of viable cells and the number of CD34+ cells were counted, and samples were additionally tested for contamination, at the following time intervals: up to 24 hours, up to 48 hours and up to 72 hours following sampling. The data were analyzed using the multivariate analysis of variance (MANOVA) and compared using McNemar's chi-square test. Significance was defined at $p < 0.05$. **Results:** Means and medians of the number of nucleated cells, number of viable cells and number of CD34+ cells decreased significantly ($p < 0.0001$) as a function of the increased time between sampling and analysis, the difference between 24 and 48 hours being less than the difference between 24 and 72 hours. A linear correlation was found between the mean number of viable cells and CD34+ cells at the three moments of analysis. Contamination testing was negative in all samples. **Conclusions:** The

increase in the interval of time from sampling until analysis negatively affected the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells but was not associated with specimen contamination. A linear correlation was found between the decrease in the number of viable cells and CD34+ cells.

Keywords: umbilical cord; quality control; adult stem cells; stem cells; fetal blood

1. Introdução

A descoberta de que células-tronco adultas (CTA), incluindo as células-tronco de tecidos hematopoéticos, podem se transformar em outros tecidos tem gerado muitas expectativas entre biólogos celulares e clínicos envolvidos em transplantes de medula óssea (Kuehnle e Goodell, 2002). Novos caminhos foram abertos para pesquisa nesta área do conhecimento e as células-tronco adultas podem ser alternativa viável à utilização de células-tronco embrionárias (Fasouliots e Schenker, 2000; Kuehnle e Goodell, 2002; Guilherme e Rocha, 2003; U-pratya et al., 2003).

Entre as possíveis fontes de células-tronco hematopoéticas encontram-se a medula óssea e o sangue de cordão umbilical (SCU). A utilização do SCU para transplantes apresenta algumas vantagens sobre a utilização de medula óssea como maior facilidade de localização da amostra, menor exigência de compatibilidade do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) entre receptor-doador, ausência de risco para o doador (mãe e recém-nascido), menor risco de transmissão de doenças infecciosas e diminuição do risco de reação grave enxerto-

hospedeiro (Fasouliotis e Schenker, 2000; Guilherme e Rocha, 2003; Chao et al., 2004). Estas características, associadas à confirmação da viabilidade celular mesmo após muito tempo de congelamento (Broxmeyer et al., 2003), incentivaram a criação de Bancos de Sangue de Cordão Umbilical (BSCU) em todo o mundo.

Os BSCU têm a função de coletar, processar, classificar e criopreservar unidades de SCU que serão posteriormente utilizadas como fonte de células-tronco hematopoéticas para transplantes, viabilizando a criação de estoques de amostras, inclusive de populações isoladas e de minorias étnicas (Fasouliotis e Schenker, 2000; Zhou, 2001; Wada et al., 2004). Os BSCU podem também estocar amostras de SCU com a finalidade de uso autólogo, confirmado por recente publicação do primeiro transplante para tratamento de leucemia na infância, com sucesso (Hayani et al., 2007)

Segundo o Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (REDOME) para que os BSCU possam disponibilizar amostras de SCU compatível entre doador e receptor para transplantes há necessidade de estocar em torno de 12.000 amostras, que atenderiam às diversas características raciais e étnicas que constituem determinada população. Idealmente, estas amostras devem ser coletadas entre as diversas etnias e em diferentes regiões geográficas. No Brasil há aproximadamente três mil indicações anuais para transplante de medula óssea. Destas indicações não se localiza doador aparentado ou compatível para 1.700 casos aproximadamente. Nessas situações, é necessário recorrer a listas de espera com tempo médio para identificação de doador compatível de seis meses, segundo o REDOME. Como se sabe que a chance de um brasileiro

localizar um doador compatível em território nacional é vinte vezes maior que a de encontrar o mesmo doador no exterior, um banco público brasileiro de SCU, se tiver o estoque de 12.000 amostras, poderia garantir a identificação de amostra compatível em praticamente 90% dos casos e o intervalo de espera seria reduzido para 20 ou 30 dias. Somando-se a isto há grande redução de despesas, pois colher e armazenar uma amostra de SCU no Brasil tem custo aproximado de três mil reais, enquanto que em unidade de SCU vinda do exterior, o custo estimado é de trinta e dois mil dólares (INCA). Como recentemente foi demonstrado que o SCU pode ser alternativa viável ao transplante de medula óssea também em adultos (Bornstein et al., 2005), cresce enormemente a importância de que os BSCU tenham amostras em número suficiente para localização do doador compatível e que estas amostras sejam provenientes de diferentes regiões geográficas, principalmente no Brasil, por suas dimensões continentais. Se a coleta de SCU for realizada somente em localidades próximas aos BSCU, diminuirá a possibilidade de localizar no estoque amostra compatível para receptor de regiões distantes.

Como o SCU tem que ser coletado no terceiro período do parto (Gluckman, 2000; Surbek et al., 2000; Rygaard e Lindenberg, 2002; Solves, 2003; Wada et al., 2004; Gluckman e Rocha, 2005), o treinamento de equipes locais para realizar a coleta nas maternidades geograficamente distantes dos BSCU possibilita obter amostras que, acondicionadas em caixas homologadas para transporte de material biológico e enviadas para processamento no BSCU, evitariam o deslocamento das pacientes. Esse procedimento tornaria

economicamente viável a diversificação das amostras estocadas. Para exemplificar, esta experiência foi mostrada em um trabalho que relatou a coleta de SCU em Honolulu, HI, e o processamento realizado em Seattle, WA, USA (Wada et al., 2004).

Como entre a coleta do SCU durante o terceiro período do parto na maternidade e o seu encaminhamento para o BSCU para ser processado existe um intervalo de tempo, que será diretamente proporcional à distância entre eles, surge o questionamento sobre o quanto esse intervalo poderia influenciar na qualidade da amostra.

Foram encontrados na literatura pesquisada diversos fatores que interferem na qualidade das unidades de SCU, como tipo de parto (cesárea ou normal), idade gestacional, sexo do recém-nascido, peso da placenta, tempo decorrido entre o parto e a coleta, coleta antes ou depois da dequitação placentária, sistemas de coleta aberto ou fechado, intervalo de tempo entre a coleta e o processamento e outros (Campos et al., 1995; Sparrow et al., 2002; Aufderhaar et al., 2003; Solves et al., 2003; Nakagawa et al., 2004; Askari, 2005). As conclusões destes trabalhos são concordantes sobre a influência destas variáveis sobre a qualidade da amostra, exceto sobre o intervalo de tempo decorrido entre a coleta e o processamento. Diversas contradições, como citações de piora acentuada dos testes de controle de qualidade após 9 e 24 horas, bons resultados com até 36 horas e até mesmo recuperação de células nucleadas viáveis após 72 horas, deixam dúvidas sobre a viabilidade da coleta em locais

distantes, devido ao aumento do intervalo de tempo (Shlebak,1999; Hubel et al., 2003; Wada et al., 2004; Tsagias et al., 2007).

Para comprovar a viabilidade da amostra de SCU para criopreservação, são realizados no BSCU testes de controle de qualidade que incluem contagem de células nucleadas, contagem das células viáveis (sem ruptura de membrana celular), contagem de células CD34+ (consideradas as células-tronco hematopoéticas) e pesquisa de contaminação da amostra, entre outros (Campos et al., 1995; Shlebak,1999; Surbek et al., 2000; Fasouliotis e Schenker, 2000; Hubel et al., 2003; U-pratya et al., 2003; Wada et al., 2004; Glukman e Rocha, 2005; Tsagias et al., 2007). Quanto maior for a distância entre o local de coleta do SCU e o BSCU, maior será o intervalo de tempo decorrido até o início do processamento e este estudo procura identificar se existiria um limite máximo a ser determinado para este intervalo, após o qual as amostras se tornariam inviáveis para a criopreservação.

Este estudo, diferente da maioria dos trabalhos sobre a influência do intervalo tempo/processamento, manteve as bolsas de SCU dentro das caixas de transporte, simulando uma situação de coleta em locais distantes e envio da amostra para o BSCU e retirando-se da mesma bolsa de SCU amostras para testes de qualidade em intervalos de até 24, até 48 e até 72 horas. A monitoração da temperatura foi realizada para comprovação de que a mesma se manteve entre os limites de 4 e 24° C dentro das embalagens de transporte, conforme determinação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004). Nos demais trabalhos, após determinado intervalo de tempo as amostras

de SCU eram submetidas aos testes, ou seja, a um controle da amostra após um determinado intervalo.

Com toda esta controvérsia, a maioria dos BSCU aceita a amostra de SCU para processamento com intervalo de no máximo 24 ou 36 horas após a coleta. No Brasil, a Resolução RDC número 153 (ANVISA, 2004) determina que o processamento do SCU deva ser efetuado em até 48 horas após a coleta.

Estas dúvidas sobre o intervalo de tempo entre a coleta e o processamento (9, 24, 36, 48 ou 72 horas) colocam em questionamento a viabilidade de coleta de SCU em locais distantes dos BSCU, pois quanto maior a distância maior será o intervalo de tempo. A determinação de um intervalo limite para aproveitamento das amostras poderia autorizar, ou não, a coleta de amostras em locais distantes dos BSCU. Se for possível determinar este intervalo e se os meios de transporte, regulamentados para transporte de material biológico, não puderem cumpri-lo, estaria contra-indicada a coleta, evitando-se custos desnecessários e descarte do SCU. Por outro lado, quanto maior for o intervalo máximo aceitável, maior a possibilidade de diversificação das amostras. Desta forma, torna-se importante estabelecer o intervalo máximo entre a coleta de SCU e o seu processamento que permita obter amostras em condições de serem criopreservadas e utilizadas no futuro.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a associação do intervalo de tempo entre coleta e processamento do sangue de cordão umbilical e a qualidade da amostra.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a variação do número de células nucleadas em diferentes intervalos de tempo estudados entre a coleta e o processamento da amostra de SCU.
- Verificar a variação do número de células viáveis em diferentes intervalos de tempo estudados entre a coleta e o processamento da amostra de SCU.
- Verificar a variação do número de células CD34+ em diferentes intervalos de tempo estudados entre a coleta e o processamento da amostra de SCU.
- Verificar se há correlação entre a variação do número de células viáveis e a variação do número de células CD34+ nos intervalos de tempo estudados entre a coleta e o processamento da amostra de SCU.
- Verificar se há contaminação da amostra nos intervalos de tempo estudados entre a coleta e o processamento da amostra de SCU.

3. Sujeitos e Método

3.1. Desenho

Estudo observacional descritivo e prospectivo.

3.2. Tamanho amostral

Como se esperava encontrar diferença significativa das variáveis a partir das 36 horas, foram coletadas 20 bolsas de SCU para amostra-piloto. Como posteriormente ficaram demonstradas as diferenças significativas, foi definido que o tamanho amostral de 20 seria suficiente para o estudo.

Foi assumido o nível de significância de 5% e poder do teste de 80%. O *software* para análise estatística foi o SAS, versão 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3.3. Definição de Variáveis

3.3.1. Variável independente

Intervalo de tempo entre a coleta da amostra de SCU na sala de parto e o processamento no BSCU, expresso em horas, calculado considerando-se:

- T_i (Tempo inicial do intervalo) como o momento em que se coleta a amostra do SCU.
- T_f (Tempo final do intervalo) como o momento em que o BSCU inicia o processamento da amostra do SCU

Categorizados em até 24, até 48 e até 72 horas. Estes períodos foram definidos arbitrariamente por questões operacionais.

3.3.2. Variáveis dependentes

- **Número de células nucleadas:** consiste na contagem em câmara de Neubauer de células nucleadas, após diluição de Turk (diluição 1/40, fator 100), sendo o número de células por mm^3 igual ao número de células contadas X diluição da amostra / por 0,4ml. O número de células totais será igual às células por $\text{mm}^3 \times 1000 \times \text{volume da bolsa (ml)}$.
- **Viabilidade celular:** contagem do número de células viáveis no total de células recuperadas, verificada através de teste com corante Trypan, no qual as células inviáveis se coram de azul.

- **Células CD34+:** contagem do número de células marcadas com o marcador de superfície celular CD 34+. Após incubação do sangue de cordão com marcadores monoclonais CD34, é realizada a leitura no citômetro de fluxo em 20.000 eventos (células).
- **Contaminação da amostra:** realizada através de cultura para aeróbio e anaeróbio, com amostra de 0,5ml de sangue de cordão umbilical para cada tubo de cultura do sistema Bact-Alert.

3.4. Seleção de sujeitos

O SCU foi coletado na Maternidade do Hospital Universitário do Departamento de Medicina da Universidade de Taubaté, de parturientes que voluntariamente concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão.

3.4.1. Critérios de inclusão

- Idade superior a 18 anos.
- Idade gestacional igual ou superior a 35 semanas.
- Peso fetal igual ou superior a 2.000g.
- Bolsa rota há menos de 18 horas.

- Trabalho de parto sem anormalidade.
- Ausência de processos infecciosos durante a gestação ou doenças que possam interferir com a vitalidade placentária.

3.4.2. Critérios de exclusão

- Sofrimento fetal grave: Mecônio acima de ++ e APGAR de 1 minuto < 5.
- Infecção durante trabalho de parto, como alterações de cor e odor de líquido amniótico.
- Temperatura materna superior a 38°C durante trabalho de parto.

A resolução RDC 153 da ANVISA determina que o número total de células nucleadas deve ser no mínimo de 5×10^8 e o volume coletado de SCU de no mínimo de 70ml para que o material possa ser processado e enviado para criopreservação. No nosso estudo não foram considerados fator de exclusão porque as bolsas foram descartadas após a realização dos testes de controle de qualidade.

3.5. Técnica e testes de controle de qualidade

Para examinar a qualidade das amostras do SCU foram realizados os testes de controle mais comumente utilizados na literatura, que incluíram a contagem do número total de células nucleadas, contagem das células nucleadas viáveis (sem ruptura de membrana celular), contagem das células CD34+ (consideradas as

células-tronco hematopoéticas) e pesquisa da presença de contaminação nos intervalos citados (Shlebak, 1999; Fasouliotis e Schenker, 2000; Surbek et al., 2000; Zhou et al.; 2001; Rygaard, 2002; Aufderhaar et al., 2003; Hubel et al., 2003; U-pratya et al., 2003; Wada et al., 2004; Bornstein, 2005; Antonenas et al.,2006; Tsagias et al., 2007).

3.5.1. Coleta do sangue de cordão umbilical

A coleta do sangue de cordão umbilical foi realizada pelo pesquisador no Centro Obstétrico, na sala de parto, durante o terceiro período do parto e após assepsia cirúrgica.

Técnica:

- Sobre a mesa auxiliar com campo estéril foram colocados os clamps utilizados para pinçar o cordão, a via de retirada da bolsa de coleta, gaze estéril embebida em álcool 70%, bolsa tripla, uma cânula de amostragem, uma seringa de 50ml e 01 agulha 40mmx12mm. Sob condições assépticas, a cânula de amostragem é introduzida em um dos acessos da bolsa principal do sistema de coleta top and bottom (FIGURA 1).

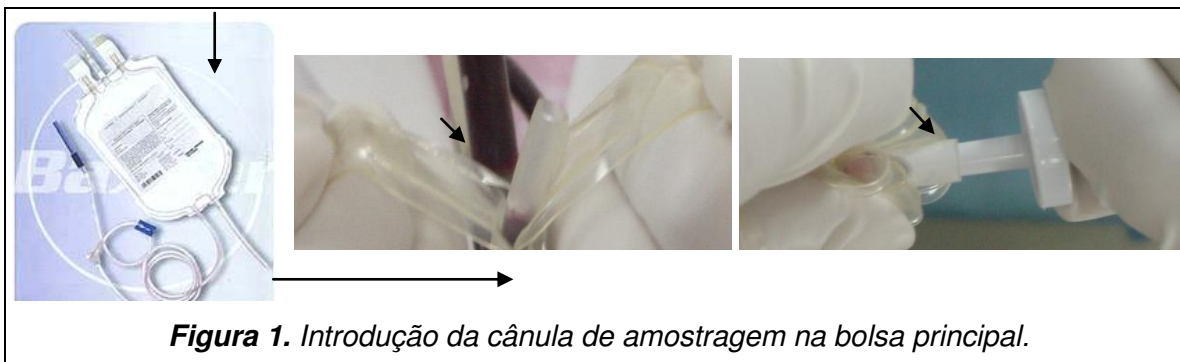


Figura 1. Introdução da cânula de amostragem na bolsa principal.

- Em seguida, 38ml de anticoagulante/preservante da bolsa principal de coleta foram drenados utilizando uma seringa de 50ml e uma agulha 40 x 12 através da cânula de amostragem já inserida (FIGURA 2).

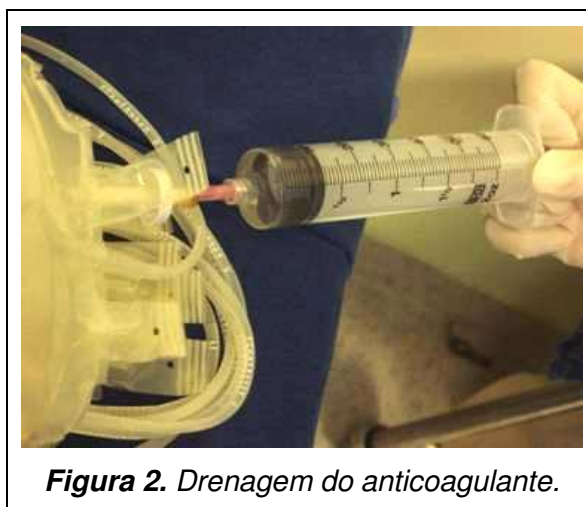


Figura 2. Drenagem do anticoagulante.

- Antes da punção venosa do cordão umbilical é verificada se a via de retirada está com o fluxo interrompido através da colocação de um *clamp* que acompanha a bolsa tripla. Isso permite aproveitar o efeito gravitacional da coluna de anticoagulante/preservante que se encontra na via de retirada (FIGURA 3).

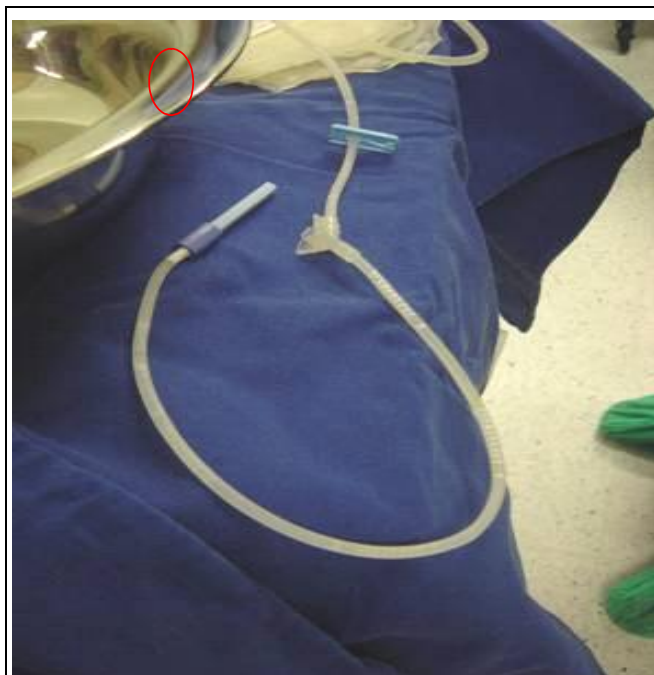
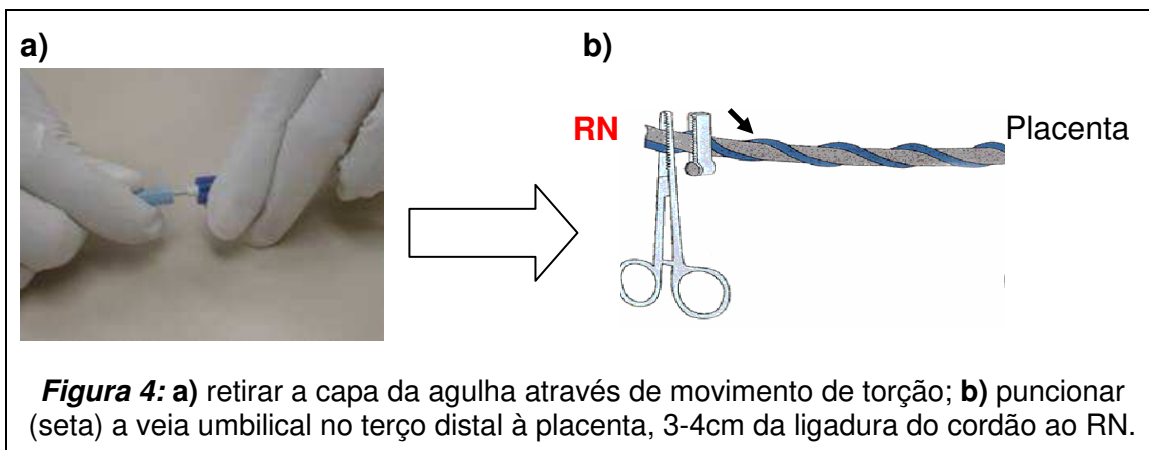


Figura 3. clamp na via de retirada.

- Após antissepsia e desencapar a agulha da bolsa, a veia umbilical é puncionada, no terço distal do cordão umbilical, a cerca de 3-4 cm da ligadura do cordão (FIGURA 4).



A bolsa é colocada abaixo da linha do cordão e da placenta para deixar que o sangue flua, por gravidade, para o interior da bolsa de coleta. Durante o fluxo de sangue, a bolsa é gentilmente agitada horizontalmente para homogeneizar o sangue com o anticoagulante.

Quando o fluxo de sangue pára, o cordão umbilical é clampeado cerca de 2cm acima do ponto de punção. A via de retirada da bolsa principal de coleta também é clampeada neste momento.

Após, abrir cuidadosamente o *clamp* do espaguete (de forma a permitir que o ar entre na via de retirada) e o sangue é empurrado da sua extremidade distal até a sua extremidade proximal. Antes que o ar chegue até a bolsa, o espaguete é novamente clampeado com pelo menos dois nós para impedir definitivamente a entrada de ar. A agulha é, então, retirada.

Se após a punção da veia do cordão umbilical não for observado fluxo de sangue, o cordão é clampeado logo acima da punção e o espaguete da bolsa também é clampeado retirando-se a agulha da veia umbilical e puncionando-se novamente em região com turgescência venosa. Se mesmo após adotadas estas medidas não for observado fluxo de sangue, com uma seringa de 50ml acoplada a uma agulha 40 x 12 , a veia umbilical é novamente puncionada em região mais próxima à placenta.

Em seguida, o sangue é aspirado para o interior da seringa até completar sua capacidade. Retirando-se a seringa e trocando-se a agulha, após fazer a

antisepsia do *sampling site* (já inserido à bolsa de coleta), puncionar o mesmo e transferir o sangue da seringa para a bolsa, gentilmente agitada horizontalmente para homogeneizar o sangue com o anticoagulante. Todo o processo descrito até aqui é realizado antes da dequitação da placenta.

A bolsa principal de coleta foi identificada com Etiqueta Autocolante contendo número de estudo, tipo de material (sangue de cordão umbilical), local, data e hora da coleta, bem como o nome do coletador (ANEXO 3).

3.5.2. Preparo e transporte do sangue de cordão umbilical

A bolsa é acondicionada em caixa térmica homologada para transporte aéreo internacional (IATA) de espécime para diagnóstico (Guidelines for Referring Biomedical Material, 2005) e encaminhada por transporte rodoviário ao BSCU para processamento e análise laboratorial.

A temperatura durante o transporte de toda unidade coletada foi monitorizada eletronicamente pelo sistema Kooltrak® (Dallas Technologies®) e mantida entre 4°C e 24°C, confirmada pelo sistema informatizado CBBANK MANAGER®, no módulo de inserção de dados da coleta, conforme protocolo adotado. Como a cidade de Taubaté fica localizada a cerca de 150km da cidade de São Paulo, todas as amostras chegaram ao destino antes de 24 horas.

3.5.3. Testes de controle de qualidade da amostra

O Banco de Sangue de Cordão Umbilical, após o recebimento da amostra de sangue de cordão, manteve as mesmas condições de acondicionamento em que foi transportada. Dentro dos intervalos de tempo determinados (até 24, até 48 e até 72 horas), em rápidas aberturas da embalagem de transporte, foram retirados 3ml da bolsa de sangue, através da cânula de amostragem. Estas amostras foram submetidos aos testes de controle de qualidade.

Para o cálculo do volume de sangue na bolsa foi pesada apenas a bolsa-mãe que contém o sangue de cordão umbilical coletado. Do peso encontrado foi descontado o peso da bolsa vazia: 37 gramas para bolsa do sistema *top-and-bottom Opti-Press (Baxter)*. O peso final encontrado foi multiplicado por 1,04 (densidade do sangue) para encontrar o volume coletado. Exemplo: peso da bolsa = 120 gramas, coletada na bolsa do sistema *Opti-Press*. Volume coletado = $(120\text{g} - 37\text{g}) \times 1,04 = 86,3\text{ml}$.

Contagem do número de células e avaliação da cultura bacteriana

- **Contagem do número de células nucleadas:** Em um tubo de ensaio 12 x 75mm foi diluído 50,0 μl da amostra em 1950,0 μl de Solução de Türk (diluição 1/40, fator 100) e preenchida a câmara de Neubauer, deixada por 5 minutos em câmara úmida. Após, foi realizada a contagem nos quadrantes A, B, C, D, e a média encontrada foi multiplicada pelo fator de diluição e dividida por 0,4 μl , o que dá o

número de células nucleadas por μl , que multiplicado por 1.000 e pelo volume da bolsa, resulta no total de células nucleadas.

- **Contagem do número de células viáveis:** O número de células nucleadas viáveis é obtido através do método da exclusão de células coradas pelo azul de Trypan a 0,4% (Sigma-Aldrich, USA ®), como descrito a seguir: Em um tubo de ensaio 12 x 75 mm foram pipetados 1950 μl de Solução Fisiológica a 0,9% e adicionados 50 μl da amostra de SCU. Em outro tubo de ensaio 12 x 75mm foram pipetados 50 μl da solução de Trypan Blue a 0,4% e adicionados 50 μl da suspensão celular obtida no primeiro tubo. Foi colocada amostra da suspensão obtida na câmara de Neubauer e incubada em câmara úmida por 5 minutos, sendo realizada, após, a contagem em microscópio óptico de aproximadamente 200 células. As células coradas em azul são as inviáveis e as não coradas (refringentes) viáveis. O percentual de células viáveis, multiplicado pelo número de células nucleadas, resultou no total de células viáveis.
- **Contagem do número de células CD 34+:** foi realizada usando-se o reagente comercial para CD 34 (ProCOUNT; Becton-Dickinson, San Jose, CA ®) e leitura por citometria de fluxo (FacsCalibur; Becton-Dickinson ®), como descrito abaixo: após ser colocado volume de SCU suficiente para conter 1 a 2 milhões de células nucleadas em tubo específico Falcon para leitura em citometria de fluxo, foram

acrescentados anticorpos monoclonais CD45 (10 microlitros) e CD34 (20 microlitros). Após, mantido o tubo em temperatura ambiente por 20 minutos e protegido da luz, um lisante de hemácias comercial foi acrescentado à solução anterior, que foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente, ainda protegida da luz. A suspensão foi submetida à centrifugação e lavada 2 vezes com solução tamponada de fosfato (PBS). Descartado o último sobrenadante, o botão de células no fundo do tubo foi ressuscitado em solução tamponada comercial (HEPES buffer). A solução final contendo as células foi aspirada para o equipamento FACScan (Becton Dickinson) de leitura tripla de laser, e foram analisadas no mínimo 20.000 eventos ou células de cada anticorpo monoclonal.

- **Avaliação da cultura bacteriana:** 0,5ml de sangue foi inoculado em cada garrafa do sistema pediátrico Bact/Alert® (bioMerieux Industry), sendo um para agente aeróbico e outro para anaeróbico. Este método permite a identificação da contaminação sem, entretanto, identificar qual a bactéria.

3.6. Instrumento para coleta de dados

Foi utilizada a Ficha para Coleta de Dados (ANEXO 4), elaborada especialmente para esta finalidade, onde foram anotados os dados referentes à identificação do número do estudo, data, horário da coleta da amostra (Ti), controle

da temperatura e resultado dos testes de qualidade da amostra realizados dentro dos intervalos pré-determinados de até 24, até 48 e até 72 horas, fornecidos pelo BSCU. As pacientes incluídas recebem um número do estudo e têm os seus dados anotados na Ficha de Registro de Coleta de SCU (Anexo 2).

3.7. Coleta de dados

No momento do parto, as parturientes que preencheram os critérios de inclusão e foram informadas dos objetivos e dos procedimentos do estudo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os dados referentes à identificação e os dados clínicos foram coletados do prontuário médico pelo próprio pesquisador, e inseridos na Ficha de Registro de Coleta de SCU (Anexo 2). Na sala de parto, no terceiro período do parto, foi coletado o sangue do cordão umbilical antes da dequitação da placenta, conforme técnica descrita.

Após a coleta foi realizado o acondicionamento do material em bolsa térmica, que foi encaminhada ao Banco de Sangue de Cordão Criogênese por transportadoras credenciadas para trabalhar com material biológico. As amostras de sangue de cordão umbilical foram processadas pelos técnicos do laboratório, nos intervalos pré-determinados de até 24, até 48 e até 72 horas, e os laudos com os resultados foram transcritos para a ficha de coleta de dados (ANEXO 4) pelo próprio pesquisador. Após o término do processamento, as amostras foram descartadas no laboratório.

3.8. Critérios para descontinuação

Amostras de sangue de cordão que foram submetidas a variações de temperatura acima dos limites estabelecidos entre 4º e 24º C e/ou não foram processadas nos intervalos de tempo pré-determinados.

3.9. Controle de Qualidade

O pesquisador realizou o pré-teste do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e do instrumento para coleta de dados, colheu as amostras de SCU, acondicionou para transporte e enviou o material para o BSCU.

3.10. Processamento e análise de dados

Os dados obtidos na ficha de coleta foram revisados manualmente e inseridos no microcomputador, processados e analisados. O programa utilizado para criar e estruturar o banco de dados foi o Epi Info, versão 6.04b (Dean et al., 1997).

A comparação das médias das variáveis aferidas foi realizada através da análise de variância para medidas repetidas MANOVA. As variáveis foram categorizadas conforme os valores de referência e os percentuais foram comparados através do teste de McNemar. O nível de significância assumido foi de 5%. O *software* para análise estatística foi o SAS versão 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

3.11. Aspectos Éticos

O presente estudo seguiu a Resolução do Conselho Nacional de Saúde, CNS 196/96, sendo submetido à aprovação do Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Também foi autorizado pela Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário da Fundação Universitária de Saúde de Taubaté (Anexos 5 e 6). Como as amostras de SCU utilizadas neste estudo foram mantidas por até 72 horas nas embalagens de transporte, foram descartadas após os testes de controle de qualidade.

4. Publicação

Untitled Document

Página 1 de 1



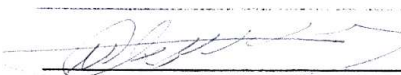
Cód Fluxo: 961

Título: **Tempo coleta/processamento e qualidade da amostra de sangue de cordão umbilical**

O(s) autor(es) do artigo, como aqui especificado, por este meio, transfere a Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB) todos os direitos autorais, título e interesses que o autor tenha, ou possa vir a ter pelo artigo e qualquer revisão ou versões dele, incluindo, mas não limitado, o direito exclusivo para imprimir, publicar e vender o artigo em todo o mundo, em todos os idiomas e em todas as mídias.

Este acordo será considerado efetivo e válido se e quando o artigo for aceito para publicação. Se o artigo contiver qualquer material protegido por direito autoral de terceiros, o(s) autor(es) entregará(ão) a RAMB permissão, por escrito, do titular dos direitos autorais para reproduzir tal material no artigo. O(s) autor(es) garante ser o detentor da titularidade do artigo; não ter concedido ou cedido qualquer direito do artigo para qualquer outra pessoa ou entidade; ser o artigo passível de requisição de direitos autorais, por seu autor; não infringir qualquer direito autoral, marca registrada ou patente; não invadir o direito de privacidade ou publicidade de qualquer pessoa ou entidade; não conter qualquer assunto difamatório; serem verdadeiras as declarações afirmadas como fatos ou estarem baseadas em pesquisa razoável para atingir precisão; e, finalmente, até onde é de seu conhecimento, que nenhuma fórmula, procedimento, ou prescrição contidas no artigo causarão dano se usados ou seguidos conforme advertências e/ou instruções contidas no artigo.

O(s) autor(es) indenizará a RAMB contra qualquer custo, despesas ou danos que a RAMB possa incorrer ou para os quais a RAMB possa se tornar sujeita como resultado de eventuais omissões destas garantias. Estas representações e garantias poderão ser estendidas a terceiros pela RAMB.


Ubirajara Costa Ferraz

CPF: 624.956.828-04

Cargo: Prof. Assist. I



Ricardo Barini

CPF: 801329878-72

Cargo: Coordenador do Programa de Medicina Fetal e Imunologia da Reprodução, Disciplina de Obstetrícia, Departamento de Tocoginecologia da UNICAMP. Coordenador do Ambulatório de Perdas Gestacionais Recorrentes, Divisão de Obstetrícia, Departamento de Tocoginecologia, CAISM /UNICAMP.


Gregório Lorenzo Acácio

CPF: 108250598-29

Cargo: Professor Assistente Doutor da Universidade de Taubaté, Taubaté, SP.

O artigo inclui material de outras fontes com direitos autorais?

Não inclui material. (se sim, por favor anexe as permissões pertinentes)

O artigo inclui ilustrações nas quais uma pessoa possa ser reconhecida?

Não inclui ilustrações. (se sim, por favor anexe as permissões pertinentes)

Authors: Ubirajara Costa Ferraz¹
Gregório Lorenzo Acácio¹
Ricardo Barini²

Institutions:

¹Department of Obstetrics and Gynecology, University of Taubaté, Taubaté, São Paulo, Brazil

²Department of Obstetrics and Gynecology – Faculty of Medical Sciences- State University of Campinas (Unicamp) – 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Corresponding author: Ricardo Barini

Rua Alexander Fleming, 101 Cidade Universitária Zeferino Vaz
13083-902 Campinas, SP, Brazil.

Telephone/Fax: +55 19 3521 9336

Email: ricardo@barini.med.br

Conflict of interest

The authors declare that there was no conflict of interest involved in carrying out this study and that the participation of Criogênese was limited to performing the quality control tests of the UCB samples and providing the investigators with the results obtained.

Título: Tempo coleta/processamento e qualidade da amostra de sangue de cordão umbilical

Autores: Ubirajara Costa Ferraz¹
Gregório Lorenzo Acácio¹
Ricardo Barini²

Institutions:

¹Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Universidade de Taubaté, Taubaté, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Obstetrícia e Ginecologia – Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), - 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

Correspondência:

Dr. Ricardo Barini

Rua Alexander Fleming, 101 Cidade Universitária Zeferino Vaz

CEP: 13083-902

Campinas – SP Email: ricardo@barini.med.br

Conflito de interesses

Os autores declaram que não há conflito de interesse que atinja este estudo e que a participação da Criogênese foi limitada a realização dos testes de controle de qualidade das amostras de sangue de cordão umbilical e fornecer aos investigadores os resultados obtidos.

Abstract

Background: The objective was to assess the association between the time from umbilical cord blood collection until processing and the quality of the sample.

Methods: Umbilical cord blood samples collected during the third stage of labor were placed in temperature-controlled boxes for the transport of biological material and sent to an umbilical cord blood bank, where the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells were counted, and samples were additionally tested for contamination at the following time intervals: up to 24 hours, up to 48 hours and up to 72 hours following sampling. The data were analyzed using the multivariate analysis of variance (MANOVA) and compared using McNemar's chi-square test. Significance was defined at $p < 0.05$. **Results:** Means and medians of the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells decreased significantly ($p < 0.0001$) as a function of the increased time between sampling and analysis, the difference between 24 and 48 hours being less than the difference between 24 and 72 hours. A linear correlation was found between the mean number of viable cells and CD34+ cells at the three moments of analysis. Contamination testing was negative in all samples. **Conclusions:** The increase in the time interval from sampling until analysis negatively affected the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells but was not associated with specimen contamination. A linear correlation was found between the decrease in the number of viable cells and CD34+ cells.

Key words: Adult Stem Cells; Cord Blood Stem Cell Transplantation; Fetal blood, Fetal Stem Cells; Quality Control; Umbilical Cord.

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação do intervalo de tempo entre coleta e o processamento do sangue de cordão umbilical e a qualidade da amostra. **Sujeitos e métodos:** As amostras de sangue de cordão umbilical, colhidas no terceiro período do parto, foram acondicionadas em caixas homologadas para transporte de material biológico, com monitoração da temperatura, e enviadas ao Banco de Sangue de Cordão Umbilical, onde foram submetidas à contagem do número de células nucleadas, do número de células viáveis, do número de células CD 34+ e pesquisa de contaminação, nos intervalos de tempo de até 24, até 48 e até 72 horas. Os dados foram analisados pelo teste de variância para medidas repetidas MANOVA e comparados através do teste qui-quadrado de Mc Nemar, considerando-se o nível de significância de 5%. **Resultados:** As médias e as medianas do número de células nucleadas, número de células viáveis e número de células CD34+ tiveram quedas significativas ($P < 0,0001$) com o aumento do intervalo de tempo coleta/ processamento, sendo entre 24 e 48 horas menor do que a comparação entre 24 e 72 horas. Constatada correlação linear entre as médias de células viáveis e células CD34+ nos três momentos da análise. A pesquisa de contaminação foi negativa em todas as amostras. **Conclusões:** O aumento do intervalo de tempo coleta/processamento influenciou negativamente na contagem de células nucleadas, células viáveis e CD34+ e não esteve associado à contaminação das amostras. Foi constatada correlação linear entre a queda do número de células viáveis e de células CD34+.

Palavras-chave: Células-Tronco Adultas; Células-Tronco Fetais; Controle de Qualidade; Cordão Umbilical; Sangue Fetal, Transplante de Sangue de Cordão Umbilical.

Introduction

In recent years, confirmation that adult stem cells (ASC) may transform themselves in other tissues has stimulated many scientists to carry out studies in this area, since these cells may represent an alternative to the use of embryonic stem cells.¹ Umbilical cord blood (UCB), one of the principal sources of ASC, has attracted the attention of scientists due to the simplicity of sample collection, complete absence of risks to the mother or the newborn infant, the reduced need for human leukocyte antigen (HLA) compatibility, lower risk of severe host-graft reaction and the lower risk of transmitting infectious and contagious diseases.² ASC may also be considered as an alternative to the use of bone marrow for the treatment of various hematological, genetic and oncological diseases, both in children²⁻⁴ and in adults.⁵

Following the successful treatment of a case of Fanconi's anemia with a UCB transplant,⁴ extensive progress was made in research in this field, and umbilical cord blood banks (UCBB) were set up in Europe, Japan, China, the USA and Brazil, as well as in other countries.

To enable a UCBB to serve as a supplier of donor-recipient compatible UCB, around 12,000 samples need to be stored to cover all the diverse racial characteristics and different ethnic origins that constitute a given population,⁶ and these should ideally be obtained from different geographical regions. Since the UCB must be collected during the third stage of labor,^{2,7,8} teams need to be

trained to perform collections in locations that are geographically distant from the UCBB. In addition, bags must be shipped in temperature controlled boxes suitable for the transport of biological material, and samples must be sent for processing, thereby avoiding having to send patients to another city and making the storage of diversified samples economically viable.⁹

An interval of time exists between UCB collection at the hospital and the sample being processed at the UCBB, and this interval tends to increase as a function of the distance between the hospital and the blood bank. A review of the literature on this subject reveals contradictions with respect to the effects of this time interval, with some investigators reporting severe deterioration in quality tests after 9 hours and 24 hours, respectively, while others have reported satisfactory results up to 36 hours.⁹⁻¹¹ In Brazil, the health regulatory authorities (ANVISA) have determined that samples should be processed within 48 hours following collection.¹²

The objective of the present study was, therefore, to establish the effect of the time between collection at the maternity hospital and processing the samples at the UCBB on the quality of the UCB. The study also investigated the presence or absence of contamination, as well as the correlation between the number of viable cells and the number of CD34+ cells at the defined time intervals.

Material and Methods

A descriptive, prospective, observational study was carried out in 20 UCB samples from recently delivered patients who voluntarily agreed to participate in the study and signed the informed consent form. All patients fulfilled the inclusion criteria and none of the exclusion criteria. The protocol was approved by the Internal Review Board of the Faculty of Medical Sciences at the State University of Campinas (Unicamp)

Inclusion criteria comprised: age > 18 years; gestational age \geq 35 weeks; fetal weight \geq 2,000 grams; amniorrhexis less than 18 hours previously; and absence of infectious processes during pregnancy or diseases that could interfere with placental vitality. Exclusion criteria consisted of: severe fetal distress (meconium over ++ and 1 minute Apgar < 5) and infection during labor (abnormalities in the color or odor of the amniotic fluid and maternal temperature > 38°C during labor).

Decree RDC 153 of the Brazilian health regulatory authorities states that the total number of nucleated cells should be at least 5×10^8 and the volume of the UCB sample collected should be at least 70 ml.¹² In the present study, these requirements were not considered exclusion factors since the bags were discarded after the quality control tests were carried out.

UCB samples were collected at the maternity unit of the teaching hospital at the University of Taubaté School of Medicine in Taubaté, São Paulo,

Brazil, during the third stage of labor, after delivery and cord clamping and prior to placental detachment, following asepsis of a segment of the cord and puncture of the umbilical vein, using a top-and-bottom bag system (Optipress®, Baxter Healthcare).

Following collection, the bag containing the UCB was stored in a temperature-controlled box containing two 400-gram units of recyclable ice, in accordance with the International Air Transport Association (IATA) ¹³ specifications for the transport of biological material for diagnosis. Temperature was monitored electronically using the Kooltrak® system (Dallas Technologies) ¹⁴ and the computerized CB Bank Manager® reading system. The samples were transported by road to the Criogênese® UCBB in the city of São Paulo, Brazil. As the two cities are 150 km apart, the time interval between collection and arrival of the samples at the UCBB was estimated to be less than 24 hours.

In the umbilical cord blood banks, the bags were kept in the temperature controlled boxes and temperature was continuously monitored. The boxes were opened quickly at the following time intervals: up to 24 hours, up to 48 hours and up to 72 hours following collection, and 3.0 ml of umbilical cord blood was removed using a sampling cannula. The samples were submitted to the most commonly used quality control tests, which included nucleated cell count, viable cell count (without rupture of cell membrane) and CD34+ cell count (CD34 being expressed in hematopoietic stem cells). ^{2,3,5,8-11,15-18}

Nucleated cell count was performed in a Neubauer counting chamber. Viable cells were counted by excluding cells stained by 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich, USA). The total number of viable cells was calculated from the percentage of viable cells multiplied by the number of nucleated cells. CD34+ cell count was performed using the commercial CD34 reagent (ProCOUNT[®], Becton-Dickinson, San José, California, USA) and reading was carried out using flow cytometry (FacsCalibur[®], Becton-Dickinson, San José, California, USA). The total number of CD34+ cells was calculated from the percentage of CD34+ cells multiplied by the number of nucleated cells.

The presence of contamination was investigated using the pediatric BacT/ALERT[®] (Biomérieux) blood culture system, one for aerobic agents and another for anaerobic agents. This method permits identification of contamination without specifying the bacterial agent.

Data were analyzed using multiple analyses of variance (MANOVA) and compared using McNemar's chi-square test, considering a significance level of 5%.

Results

All the twenty boxes containing bags of UCB samples arrived at the UCBB within 24 hours of collection. The volume of the bags varied between 31 and 139.4 ml (mean 80.6 ± 31.7 ml; median 72.5 ml). The total number of nucleated cells ranged from 206 million to 3.4 billion with a mean of 1.1 billion in the first 24

hours, decreasing to a mean of 1.03 billion at 48 hours and 841 million at 72 hours, differences that were statistically significant ($p < 0.0001$) (Table 1).

The number of viable cells varied from 202 million to 3.3 billion with a mean of 1.1 billion in the first 24 hours, decreasing progressively to a mean of 967 million at 48 hours and 711 million at 72 hours, differences that were also statistically significant ($p < 0.0001$) (Table 1).

The number of CD34+ cells ranged from 672 thousand to 23 million with a mean of 6.3 million in the first 24 hours, decreasing progressively to a mean of 5.5 million at 48 hours and 4 million at 72 hours, differences that were statistically significant ($p < 0.0001$) (Table 1). Comparison of the means at 24 and 48 hours showed a smaller but still statistically significant decrease compared to the difference in the means at 24 and 72 hours (Figure 1).

The variations in the number of viable cells and CD34+ cells were compared and a linear correlation was found between the three moments of analysis (up to 24 hours, up to 48 hours and up to 72 hours) (Table 2).

Discussion

Confirmation of the usefulness of adult stem cells in the treatment of hematological diseases opened the gateway to further research into the different sources of obtaining these cells. One source that has grown in importance is

umbilical cord blood, since collection is simple and poses no risk to the donor. In addition, it requires a lesser degree of HLA donor-recipient compatibility compared to bone marrow, for example.

In Brazil, the large geographical area of the country and the ethnical diversity of its population may limit the use of umbilical cord blood due to the difficulty in identifying a compatible donor, despite knowing that the chance of a Brazilian finding a donor in Brazil is thirty times greater than the chance of finding a compatible donor abroad, according to a study carried out by the National Registry of Bone Marrow Donors (REDOME).¹⁹

Of approximately 3,000 patients referred annually for bone marrow transplant, 1,700 are unsuccessful in identifying a compatible donor among relatives, and are obliged to resort to the waiting list in which the average delay in identifying a compatible donor is six months.¹⁹ To facilitate identification of a compatible donor and to reduce waiting time, great interest is currently being shown in ensuring that UCBBs are able to store a sufficient number of samples originating from different geographical regions of the country.

A public umbilical cord blood bank with 12,000 samples in stock guarantees identification of a compatible sample in practically 90% of cases and the waiting time can be reduced to 20 days.¹⁹ In addition, a great reduction in costs may be achieved, since to collect and store a UCB sample in Brazil costs

around \$2,300 compared to a cost of around \$ 60,000 if the sample were to be obtained abroad.¹⁹

In agreement with data published in the literature, the present study shows that the quality of umbilical cord blood deteriorates as a function of the length of time between collection and processing at blood banks.⁹⁻¹¹ In Brazil, the RDC 190/2003²⁰ directive issued by the health regulatory authorities (ANVISA) requires that UCB samples be processed within 36 hours following collection; however, the RDC 153/2004 directive extended this interval to up to 48 hours. In the international studies reviewed, the majority establish criteria of 24 or 36 hours as the upper limit for accepting samples for processing.

Based on the findings of this small sample, it is impossible to either corroborate or refute the limits established by ANVISA. Although the decrease in the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells was evident, no precise cut-off point was established. It is clear, however, that the interval between collection and processing should be the minimum possible.

In the present study, no contamination of the samples occurred as a function of the increase in the time interval between collection and processing, probably due to the fact that all the samples were collected by the same investigator and rigorous asepsis criteria were adopted.

In addition, a linear correlation was found between the variation in the mean percentage of the number of viable cells and CD34+ cells. When the variation in median percentage was calculated, a greater increase was observed in the variation of the viable cells in relation to the CD34+ cells in the interval between 24 and 72 hours. Confirmation of the existence of this correlation is important, since cell viability is measured more easily and at a lower cost than CD34+ cell count.

These findings confirm that an increase in the time interval between collection and processing negatively affects the quality of the UCB sample and this should encourage the development of further studies with larger sample sizes that are required to confirm the present results. These data may be useful for establishing national policies to define the geographical location of UCBBs, permitting samples to be collected from geographically diverse populations while guaranteeing rapid processing and freezing, thereby preserving the quality of samples and increasing the likelihood of identifying donor-recipient compatible samples.

Conclusions

The increase in the time interval from sampling until analysis negatively affected the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells but was not associated with specimen contamination. A linear correlation was found between the decrease in the number of viable cells and CD34+ cells.

Acknowledgments:

The authors would like to acknowledge the collaboration of Criogênese Serviços Médicos S/C Ltda., specifically the director of the company, Dr. Nelson Hidekazu, who played an essential role in making this study feasible.

References

1. Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ* 2002; 325 (7360):372-376.
2. Fasouliotis SJ, Schenker JG. Human umbilical cord blood banking and transplantation: a state of the art. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 90(1):13-25.
3. Smith FO, Thomson BG. Umbilical cord blood collection, banking, and transplantation: current status and issues relevant to perinatal caregivers. *Birth* 2000; 27(2):127-135.
4. Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* 2005; 7(3):219-227.
5. U-pratya Y, Boonmoh S, Promsuwicha O, Theerapitayanon C, Kalanchai L, Chanjerboon V, et al. S. Collection and processing of umbilical cord blood for cryopreservation. *J Med Assoc Thai* 2003; 86 (11):1055-1062.
6. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer - <http://www.inca.gov.br>.
7. Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2000; 28(11):1197–1205.
8. Surbek DV, Visca E, Steinmann C, Tichelli A, Schatt S, Hahn S, et al. Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increases

- cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183(1):218-221.
9. Wada RK, Bradford A, Moogk M, Yim R, Strong DM, Drachman J, et al. Cord blood units collected at a remote site: a collaborative endeavor to collect umbilical cord blood through the Hawaii Cord Blood Bank and store the units at the Puget Sound Blood Center. *Transfusion* 2004, 44(1):111-118.
 10. Shlebak AA, Marley SB, Roberts IA, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23(2):131-136.
 11. [My paper] Tsagias N, Kouzi-Koliakos K, Karagiannis V, Alamdar DH, Koliakos G. Time and temperature before processing influence the recovery of umbilical cord blood hematopoietic progenitors. *Transfusion* 2007; 47(8):1550-1552.
 12. ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 153, de 14 de junho de 2004.
 13. IATA - International Air Transport Association. www.iata.org/
 14. Kooltrak® – Dallas Technologies®. www.kooltrak.com/data-loggers-v/sysint.html
 15. Campos L, Roubi N, Guyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells. *Cryobiology* 1995; 32(6):511-515.

16. Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Short-term liquid storage of umbilical cord blood. *Transfusion* 2003; 43(5):626-632.
17. Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2004; 354-371.
18. Rodríguez L, García J, Querol S. Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11(4):247-251.
19. REDOME – Registro Nacional de doadores de Medula Óssea – INCA.
www.inca.gov.br
20. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 190, de 18 de julho de 2003.

Table 1: Blood volume, variation in the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells at intervals of time of up to 24 hours, up to 48 hours and up to 72 hours in bags of umbilical cord blood (UCB).

Bags of UCB	n	Mean	Standard deviation	Median	Minimum	Maximum
Volume Collected	20	80.6	31.7	72.5	31	139.4
Nucleated cells						
Up to 24 hours	20	11 x 10 ⁸	9.0 x 10 ⁸	7.9 x 10 ⁸	2.0 x 10 ⁸	34 x 10 ⁸
Up to 48 hours	20	10 x 10 ⁸	7.9 x 10 ⁸	7.2 x 10 ⁸	1.8 x 10 ⁸	29 x 10 ⁸
Up to 72 hours	20	8.4 x 10 ⁸	5.9 x 10 ⁸	6.3 x 10 ⁸	1.4 x 10 ⁸	19 x 10 ⁸
Viable cells						
Up to 24 hours	20	11 x 10 ⁸	8.8 x 10 ⁸	7.7 x 10 ⁸	2.0 x 10 ⁸	33 x 10 ⁸
Up to 48 hours	20	9.6 x 10 ⁸	7.3 x 10 ⁸	6.8 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁸	26 x 10 ⁸
Up to 72 hours	20	7.1 x 10 ⁸	5.0 x 10 ⁸	5.3 x 10 ⁸	1.2 x 10 ⁸	16 x 10 ⁸
CD34+ cells						
Up to 24 hours	20	6.3 x 10 ⁶	6.3 x 10 ⁶	4.3 x 10 ⁶	0.6 x 10 ⁶	23 x 10 ⁶
Up to 48 hours	20	5.5 x 10 ⁶	5.4 x 10 ⁶	3.7 x 10 ⁶	0.5 x 10 ⁶	19 x 10 ⁶
Up to 72 hours	20	4.0 x 10 ⁶	3.7 x 10 ⁶	3.1 x 10 ⁶	0.3 x 10 ⁶	12 x 10 ⁶

Table 2: Correlation between the variations in the number of viable cells and CD34+ cells at the following time intervals: up to 24 hours, up to 48 hours and up to 72 hours.

Interval of time	r*	p-value
Up to 24 hours	0.86	<0.0001
Up to 48 hours	0.83	<0.0002
Up to 72 hours	0.85	<0.0003

* Spearman's rank correlation coefficient.

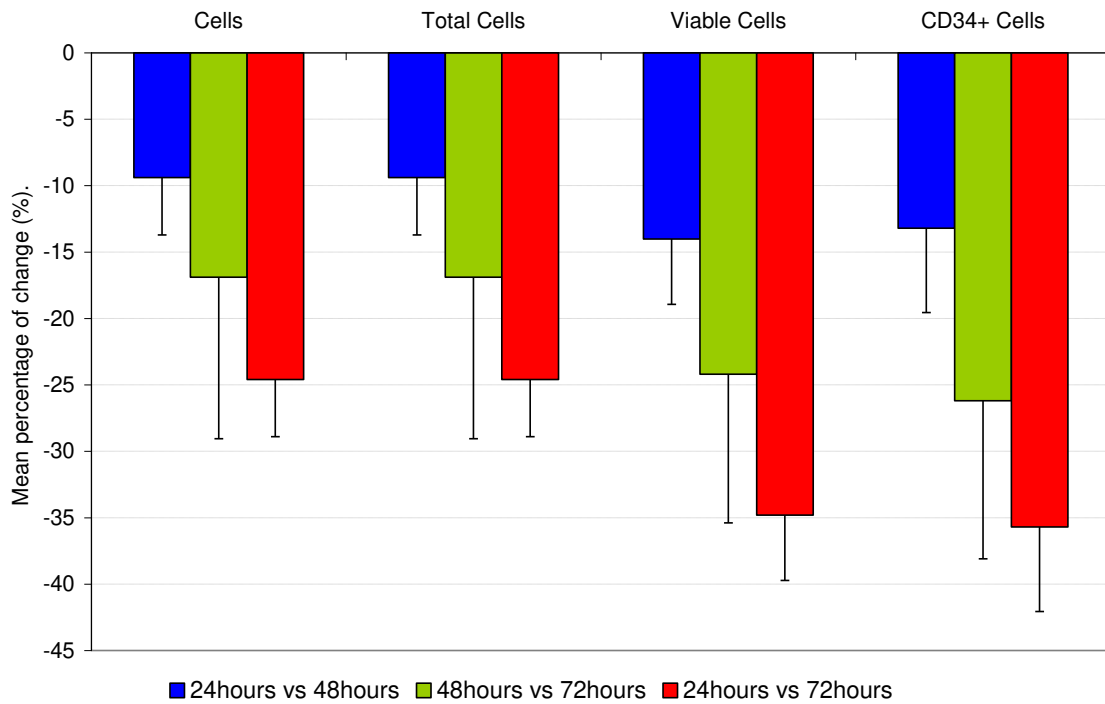


Figure 1: Variation in the mean percentage of the number of nucleated cells, viable cells and CD34+ cells in UCB bags between the following time intervals: 24 vs. 48 hours, 48 vs. 72 hours and 24 vs. 72 hours (95%CI).

5. Conclusões

- O aumento do intervalo de tempo coleta/processamento diminui, de maneira estatisticamente significativa, o número de células nucleadas.
- O aumento do intervalo de tempo coleta/processamento diminui, de maneira estatisticamente significativa, o número de células viáveis.
- O aumento do intervalo de tempo coleta/processamento diminui, de maneira estatisticamente significativa, o número de células CD34+.
- Foi constatada uma correlação entre a variação linear do número de células viáveis e células CD34+ nos intervalos estudados.
- Não ocorreu contaminação das amostras com o prolongamento do intervalo coleta/processamento.

6. Referências Bibliográficas

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 190, de 18 de julho de 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n* 153, de 14 de junho de 2004.

Askari S, Miller J, Chrysler G, McCullough J. Impact of donor- and collection-related variables on product quality in ex utero cord blood banking. *Transfusion* 2005; Feb; 45(2):189-94.

Aufderhaar U, Holzgreve W, Danzer E, Tichelli A, Troeger C, Surbek DV. The impact of intrapartum factors on umbilical cord blood stem cell banking. *J Perinat Med* 2003; 31(4):317-22

Bornstein R, Flores AI, Montalban MA, Del Rey MJ, de la Serna J, Gilsanz F. A modified cord blood collection method achieves sufficient cell levels for transplantation in most adult patients. *Stem Cells* 2005 mar; 23(3):324-34.

Broxmeyer HE, Srour EF, Hangoc G, Cooper S, Anderson SA, Bodine DM. High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; Jan 21; 100(2):645-50.

Campos L, Roubi N, Guyotat D. Definition of optimal conditions for collection and cryopreservation of umbilical cord hematopoietic cells. *Cryobiology* 1995; 32(6):511-5.

Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2004; 354-71.

Fasouliotis SJ, Schenker JG. Human umbilical cord blood banking and transplantation: a state of the art. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; May; 90(1):13-25.

Gluckman E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 2000; 28(11):1197-1205.

Gluckman E, Rocha V. History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells. *Cytotherapy* 2005; 7(3):219-27.

Guidelines for Referring Biomedical Material: Packaging and Shipping
Minnesota Department of Health Date: July 2005.

Guilhermo FS, Rocha V. Umbilical cord blood transplantation: current status and future directions. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2003, 8:109-17.

Hayani A, Lampeter E, Viswanatha D, Morgan D, Salvi S. First Report of Autologous Cord Blood Transplantation in the Treatment of a Child With Leukemia. *Pediatrics* 2007; 119(1): e296-e300 (doi:10.1542/peds.2006-1009).

Hubel A, Carlquist D, Clay M, McCullough J. Short-term liquid storage of umbilical cord blood. *Transfusion* 2003;43(5):626-32.

IATA. International Air Transport Association. www.iata.org/

Kooltrak® - Dallas Technologies®. www.kooltrak.com/data-loggers-v/sysint.html

Kuehnle I, Goodell MA. The therapeutic potential of stem cells from adults BMJ 2002; 325(7360):372-6.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer - <http://www.inca.gov.br>.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea (Redome). www.inca.gov.br/

Nakagawa R, Watanabe T, Kawano Y, Kanai S, Suzuka H, Kaneko M, et al. Analysis of maternal and neonatal factors that influence the nucleated and CD34+ cell yield for cord blood banking. Transfusion 2004; feb;44(2):262-7

Rodríguez L, García J, Querol S. Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft. Biol Blood Marrow Transplant 2005; 11(4):247-51.

Rygaard K, Lindenberg S. Stem Cells for obstetricians and gynecologists. Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica Volume 81, Number 5, May 2002; pp. 383-388(6)

Shlebak AA, Marley SB, Roberts IA, Davidson RJ, Goldman JM, Gordon MY. Optimal timing for processing and cryopreservation of umbilical cord haematopoietic stem cells for clinical transplantation. Bone Marrow Transplant. 1999, Jan; 23(2):131-6.

Smith FO, Thomson BG. Umbilical cord blood collection, banking, and transplantation: current status and issues relevant to perinatal caregivers. Birth 2000; 27(2):127-35.

Solves P, Moraga R, Saucedo E, Perales A, Soler MA, Larrea L, et al. Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. Bone Marrow Transplant 2003; 31(4):269-73.

Sparrow RL, Gauchi JA, Ramadi LT, Waugh CM, Kirkland MA. Influence of mode of birth and collection on WBC yields of umbilical cord blood units. Transfusion 2002; 42:210-5

Surbek DV, Visca E, Steinmann C, Tichelli A, Schatt S, Hahn S, et al. Umbilical cord blood collection before placental delivery during cesarean delivery increases cord blood volume and nucleated cell number available for transplantation. Am J Obstet Gynecol 2000; 183(1):218-21.

[\[My paper\]](#) Tsagias N, Kouzi-Koliakos K, Karagiannis V, Alamdar D, Koliakos G. Time and temperature before processing influence the recovery of umbilical cord blood hematopoietic progenitors. Transfusion 2007; 47 (8):1550

U-pratya Y, Boonmoh S, Promsuwicha O, Theerapitayanon C, Kalanchai L, Chanjerboon V, et al. Collection and processing of umbilical cord blood for cryopreservation. J Med Assoc Thai 2003; 86(11):1055-62

Wada RK, Bradford A, Moogk M, Yim R, Strog DM, Drachman J, et al. Cord blood units collected at a remote site: a collaborative endeavor to collect umbilical cord blood through the Hawaii Cord Blood Bank and store the units at the Puget Sound Blood Center. Transfusion 2004; 44 (1): 111.

Zhou SL, Song DG, Shen BJ, Pan J. Quality Control in Umbilical Cord Blood Bank. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2001 Mar; 9(1):86-90.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Tempo coleta-processamento e qualidade de amostra de sangue de cordão umbilical

Responsável: Dr. Ubirajara Costa Ferraz

Nome: _____

Idade: _____ RG: _____

Endereço: _____ Telefone: _____

Número do prontuário médico: _____

Número no estudo: _____

Eu entendo que fui convidada a participar em uma de um estudo que vai utilizar o sangue do cordão umbilical após o meu parto e que o objetivo é realizar exames de laboratório no material colhido.

Foi me explicado que o sangue do cordão umbilical será retirado após o parto e depois da ligadura do cordão, não existindo nenhum risco que possa afetar a minha saúde ou a do meu filho(a) e que o sangue coletado seria desprezado junto com a placenta. Também fui informada que o sangue colhido será descartado após a realização dos testes laboratoriais necessários para a realização do estudo.

Eu entendo que não obterei nenhuma vantagem direta com a minha participação nesse estudo e que qualquer dúvida que eu venha a ter ou informação adicional que eu venha a querer poderei contatar o Dr. Ubirajara Costa Ferraz no Tel.: 012-3635.3388 ou Comitê de Ética e Pesquisa da UNICAMP no tel. (19) 3788.8936.

Também entendo que todas as informações médicas, assim como os resultados desta pesquisa serão mantidos em sigilo e, se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

Sei que minha participação é voluntária e que eu posso me recusar a participar ou retirar meu consentimento e interromper a minha participação no estudo a qualquer momento, sem comprometer os cuidados médicos que recebo atualmente ou receberei no futuro.

Eu confirmo que o Dr. Ubirajara Costa Ferraz explicou-me o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetida e a inexistência de risco ou desconforto. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi esse formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar desse estudo.

Nome e RG do participante

Assinatura do participante

Data

7.2. Anexo 2 – Ficha de registro de coleta de SCU

FICHA DE REGISTRO DE COLETA DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL

Tempo coleta-processamento e qualidade da amostra de sangue de cordão umbilical

NÚMERO DE ESTUDO: |_|_|_|_|

Dados da Identificação:

RN de _____

RG: _____ Idade: _____

Número de prontuário médico _____

Data: _____

Obstetra: _____

Maternidade: _____

Número da bolsa de coleta: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Est.: _____ CEP: _____

Telefone residencial: _____ Telefone comercial: _____

Gesta: |_|_| Para: |_|_| Aborta/: |_|_| Normal: |_|_| Cesárea: |_|_|

Idade gestacional: |_|_| semanas

Sexo RN: |_| – homem |_| – mulher

Raça RN: |_| – branca |_| – não branca

Bolsa rota: |_| – Sim |_| – Não

Tempo de bolsa rota: |_| – menos de 18 horas |_| – mais de 18 horas

Peso RN: |_|_|_|_| – gramas

Apgar: 1 minuto: |_|_| |_|_| 5 minutos

Dados da coleta:

Parto: – via vaginal – via cesariana
Coleta: – pré-dequitação – pós-dequitação
Intercorrências com o parto: – sim – não
Início da coleta: |||| horas/min
Término da coleta: |||| horas/min
Intercorrências com a coleta: – sim – não

Descrição: _____

Coletado por: _____

Assinatura do coletador: _____

7.3. Anexo 3 – Identificação da bolsa

**Tempo coleta-processamento e
qualidade da amostra de sangue
de cordão umbilical**

Número do estudo: |_|_|_|_|

Material: Sangue de Cordão Umbilical

Taubaté,

Hora da coleta: |_|_|_|_| hora/min

Coletado por:

7.4. Anexo 4 – ficha de coleta de dados

FICHA DE COLETA DE DADOS

Tempo coleta-processamento e qualidade de amostra de sangue de cordão umbilical

NÚMERO DE ESTUDO: |_|_|_|_|

Data da coleta: |_|_|_|_|_|_|_|_|

Hora da coleta: |_|_|_|_|_| Horas/min

Temperatura entre 4° e 24° C: |_|_| 1 – Sim |_|_| 2 - Não

Processamento Até 24 hs Até 48 hs Até 72 hs

Nº cels nucleadas: |_|_|_| x 10⁸ |_|_|_| x 10⁸ |_|_|_| x 10⁸

Nº cels viáveis: |_|_|_| x 10⁸ |_|_|_| x 10⁸ |_|_|_| x 10⁸

Nº cels CD34+: |_|_|_| x 10⁶ |_|_|_|x 10⁶ |_|_|_| x 10⁶

Contaminação: |_|_| 1 – presente |_|_| 2 – ausente

7.5. Anexo 5 – Aprovação do Comitê de Ética da Unicamp

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-7187
🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 20/12/05.
(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 768/2005
CAAE: 1702.0.146.275-05

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “TEMPO COLETA-PROCESSAMENTO E QUALIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Ubirajara Costa Ferraz

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 05/12/05

II - OBJETIVOS

A pesquisa visa avaliar a associação do tempo entre coleta-processamento com alterações na qualidade da amostra de sangue de cordão umbilical.

III - SUMÁRIO

Trata-se um estudo observacional de coorte longitudinal que utilizará como sujeito o sangue de cordão umbilical coletado no terceiro período do parto de parturientes. O sangue do cordão umbilical será coletado, na Maternidade do Hospital Universitário da UNITAU, Taubaté-SP, de 20 parturientes, sendo enviado para processamento no Banco de Sangue de Cordão Umbilical onde serão realizados testes laboratoriais que verificam a qualidade da amostra (número de células nucleadas, células variáveis, células CD34⁺ e presença de contaminação). As amostras de sangue do cordão umbilical colhidas serão descartadas após realização dos testes laboratoriais.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

A utilização do sangue de cordão umbilical como fonte de células tronco apresenta algumas vantagens sobre a utilização de medula óssea, como maior facilidade de localização da amostra e avaliação de compatibilidade antígeno leucocitário humano (HLA), ausência de risco para o doador (mãe e recém-nascido), menor risco de transmissão de doenças infecciosas, diminuição do risco de reação grave enxerto-hospedeiro e menor exigência de compatibilidade HLA para seleção doador-receptor). O projeto está bem estruturado com critérios e objetivos definidos. O TCLE está bem resumido, porém explicativo. Apresenta orçamento detalhado para material de consumo, exames laboratoriais e transporte de amostras.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).


O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 20 de dezembro de 2005.


Prof. Dr.ª Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

7.6. Anexo 6 – Aprovação da Comissão de Ética da FUST - Taubaté.



FUST – FUNDAÇÃO UNIVERSITÁRIA DE SAÚDE DE TAUBATÉ
Comissão de Ética Médica

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO - C.G.C. 48.965.164/0001-80
TELEFONE: (012) 3625-7527

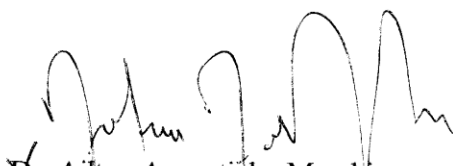
Av. Granadeiro Guimarães, 270, CEP - 12020-130
TELEFAX: (012) 3625-7573

PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA SOBRE O PROJETO DE PESQUISA INTITULADO “TEMPO DE COLETA-PROCEDIMENTO E QUALIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL”

Autor(a): Dr. Ubirajara Costa Ferraz

Em resposta a vossa solicitação de parecer da Comissão de Ética Médica do Hospital Universitário de Taubaté, sobre o trabalho acima, que contará com a sua participação, vimos por meio deste comunicar que o protocolo deste trabalho foi por nós analisado e a ele conferimos a nossa aprovação integral, visto que respeita todos os princípios éticos fundamentais da pesquisa biomédica, com risco pequeno e com necessidade do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Taubaté, 17 de fevereiro de 2006.



Dr. Ailton Augustinho Marchi
Presidente da Comissão de Ética Médica