

Mestrado em Análises Clínicas

Leucemia Mieloide Crónica-
Do diagnóstico à monitorização da
doença

Ana Luísa de Castro Vieira

M

2022





Leucemia Mieloide Crónica-

Do diagnóstico à monitorização da doença

Monografia

Monografia realizada no âmbito do estágio curricular do 2º Ciclo de estudos conducentes ao Grau de Mestre em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Alice Santos Silva
com coorientação do Professor Doutor Luís Belo

Ana Luísa de Castro Vieira

outubro de 2022

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA MONOGRAFIA APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Resumo

A Leucemia Mieloide Crônica (LMC) é uma neoplasia resultante de uma mutação numa *stem cell* da medula óssea (MO) que afeta diferentes linhas celulares, com alterações no processo de hematopoiese, em que se produz de forma descontrolada células maduras da linha granulocítica, aumentando o seu valor na MO e sangue periférico (SP). Caracteriza-se assim, por proliferação excessiva e apoptose reduzida de células mieloides. Existem vários tipos de LMC, sendo a mais prevalente, a LMC Filadélfia positiva (Ph+), que representa cerca de 15% das leucemias, que será abordada nesta monografia.

A prevalência é mais elevada em adultos do sexo masculino, sendo rara a sua apresentação em crianças. O aparecimento de sintomas ocorre de forma lenta e progressiva o que faz com que o paciente possa permanecer muito tempo assintomático, com alterações bioquímicas e hematológicas que são habitualmente detetadas em exames laboratoriais de rotina.

A LMC foi a primeira doença neoplásica descrita envolvendo uma anomalia genética- a presença do cromossoma Filadélfia (Ph)- resultante de uma translocação cromossômica característica t (9; 22) (q34; q11.2), que leva à formação do gene de fusão *BCR-ABL1*. A proteína resultante tem uma atividade exacerbada de tirosina quinase que pode conduzir à transformação leucémica, uma vez que a ativação de vias pode levar à progressão da fase crónica (FC) para fases avançadas da doença: acelerada (FA) e blástica (FB).

A Reação leucemoide e os síndromes mieloproliferativos têm uma apresentação clínica e hematológica semelhante à LMC, pelo que o diagnóstico diferencial é indispensável. Os ensaios citogenéticos e moleculares são de grande importância para o diagnóstico, prognóstico, tratamento e monitorização da LMC, que neste momento incluem técnicas de citogenética convencional e molecular e RT-PCR de amostras de MO e SP.

O prognóstico da LMC varia de acordo com a fase evolutiva da doença. A identificação e deteção do oncogene de fusão *BCR-ABL1* revolucionou o tratamento de pacientes, permitindo o desenvolvimento de fármacos direcionados, os inibidores da tirosina quinase (TKIs), que reduziram a taxa de mortalidade em pacientes com LMC e aumentaram a taxa de sobrevivência.

Os TKIs são a terapia padrão para a LMC, apesar dos efeitos adversos e possibilidade de doença residual após a descontinuação do tratamento. Há vários TKIs aprovados e a escolha deve ser baseada em fatores específicos relacionados com o paciente (idade, comorbidades) e com fatores relacionados com a doença (prognóstico baseado em *scores*). É possível surgirem resistências, que em casos específicos poderão levar a optar por transplante de MO.

Esta monografia pretende fornecer uma revisão geral sobre a LMC, focando subtemas como o diagnóstico e monitorização, que estão particularmente associados à componente laboratorial, enquadrando o presente mestrado em análises clínicas.

Palavras-chave: Leucemia mieloide crónica; cromossoma Filadélfia; gene *BCR-ABL1*; inibidores da tirosina quinase; RT-PCR.

Abstract

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a neoplasm resulting from a mutation in a bone marrow (BM) stem cell that affects different cell lines, with changes in the hematopoiesis process and produces uncontrolled mature cells of the promyelocytic line, increasing their value in BM and peripheral blood (PB). It is thus characterized by excessive proliferation and reduced apoptosis of nucleoid cells. There are several types of CML, the most prevalent being the positive Philadelphia CML (Ph+), which represents about 15% of leukemias, which will be addressed in this monograph.

The prevalence is higher in male adults, and its presentation in children is rare. The onset of symptoms occurs slowly and progressively, which means that the patient may remain asymptomatic for a long time, with biochemical and hematological changes that are usually detected in routine laboratory tests.

CML was the first neoplastic disease involving a genetic abnormality - the presence of the Philadelphia chromosome (Ph) - resulting from a characteristic t (9; 22) (q34; q11.2) chromosomal translocation, which leads to the formation of the *BCR-ABL1* fusion gene. The resulting protein has heightened tyrosine kinase activity that may have led to the leukemic transformation, as activation of the pathways can lead to progression from the chronic phase (CP) to advanced phases of the disease: accelerated (AP) and blastic (BP).

Leukemoid reaction and myeloproliferative syndromes have a clinical and hematological presentation similar to CML, so the differential diagnosis is essential. Cytogenetic and molecular assays are of great importance for the diagnosis, prognosis, treatment and monitoring of CML, which at the moment include conventional and molecular cytogenetic techniques and RT-PCR of BM and SP samples.

The prognosis of CML varies according to the evolutionary stage of the disease. The identification and detection of the *BCR-ABL1* fusion oncogene has revolutionized patient care, allowing the development of targeted drugs, tyrosine kinase inhibitors (TKIs), that have reduced the mortality rate in CML patients and improved long-term outcome, estimated close to that of the general population. Increased survival rate.

TKIs are the standard therapy for CML, despite adverse effects and the possibility of residual disease after discontinuation of treatment. Several TKIs are approved and the choice should be based on specific patient-related factors (age, comorbidities) and disease-related factors (score-based prognosis). Resistance may arise, which in specific cases may lead to opting for OM transplantation.

This monograph aims to provide a general review of CML, focusing on sub-themes such as diagnosis and monitoring, which are particularly associated with the laboratory component, framing the present master's degree in clinical analysis.

Keywords: Chronic myeloid leukemia; Philadelphia chromosome; *BCR-ABL1* gene; tyrosine kinase inhibitors; RT-PCR.

Índice

Resumo.....	iv
Abstract	iv
Agradecimentos	viii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xiii
1. Introdução	1
2. Epidemiologia e etiologia.....	4
3. Fisiopatologia e fases da doença.....	5
3.1. Fase crónica	10
3.2. Fase acelerada	10
3.3. Fase blástica.....	11
4. Sinais e Sintomas	14
5. Diagnóstico laboratorial.....	15
5.1. Hemograma	15
5.2. Exame morfológico da medula óssea.....	19
5.3. Análise citogenética	20
5.3.1. FISH.....	21
5.4. Testes moleculares	22
5.4.1. <i>Rt-PCR</i>	23
5.4.2. <i>Ngs</i>	24
5.4.3. <i>Western blot</i>	24
5.4.4. Citometria de fluxo para imunofenotipagem	24
5.5. Achados bioquímicos	25
6. Diagnóstico diferencial	25
7. Prognóstico.....	31
7.1. <i>Score</i> de Sokal	31
7.2. <i>Score</i> de Hasford	32
7.3. <i>Score EUTOS</i>	32
7.4. <i>Score EUTOS-ELTS</i>	33
8. Tratamento-Abordagem terapêutica.....	36
9. Monitorização.....	38
9.1. Testes citogenéticos.....	39
9.2. Testes moleculares	39
9.2.1. <i>RT-qPCR</i> e <i>dPCR</i>	40
9.2.2. <i>NGS</i>	42

9.2.3. Biossensor DNA.....	44
9.2.4. Imunoesferas de citometria de fluxo.....	43
9.2.5. <i>CBA</i>	43
9.2.6. Sequenciamento de células únicas.....	44
10. Resposta terapêutica	44
10.1. Resposta hematológica	44
10.2. Resposta citogenética	45
10.3. Resposta molecular	45
11. Tempo de sobrevivência, sucesso e remissão livre de tratamento.....	49
12. Conclusão.....	50
Referências bibliográficas.....	52

Agradecimentos

À minha família querida, pais, irmãos, sobrinhos e cunhados por todos os momentos de amor, afeto e diversão. Sempre acreditaram em mim e sempre me deram todo o apoio, incentivando a nunca desistir.

Ao meu namorado e companheiro Renato, por todo o amor, compreensão, ajuda e paciência.

Às minhas primas Flávia, Márcia, Rita e Fabiana por partilharem a infância comigo e por serem muito especiais. Muito obrigada Flávia por me convenceres a estudar novamente e por toda a ajuda no começo desta fase tão atribulada.

À Joana, amiga de sempre e para sempre e Cristiana por todo o companheirismo.

À Nádia, Cláudia e restantes colegas do Drive-Thru de Gondomar, que fizeram de momentos tão complicados e trabalhosos de pandemia, ótimos momentos em família, com muita partilha. Obrigada, também por todo o incentivo no estudo.

Ao Doutor Carlos Mendes, diretor do serviço de hematologia do IPO, pela disponibilidade e carinho com que me recebeu nas instalações.

À Professora Doutora Alice Santos Silva e Professor Doutor Luís Belo, meus orientadores nesta monografia, muito obrigada pelos conselhos, disponibilidade e paciência.

Por fim, mas não menos importante, queria agradecer aos colegas do MAC, pelo trabalho em equipa e a todo o corpo docente por toda a partilha de conhecimento.

Lista de Abreviaturas

ABL1- *Abelson Murine Leujemia viral oncogene homolog 1*

ABL2- *ABL Proto-Oncogene 2*

ACAS- *additional chromosomal aberrations*

ASXL1- *addition sex combs like 1*

BCR- *Breakpoint Cluster Region*

BMI1- *B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*

CALR- *calreticulina*

CBA- *cytometric bead array*

cDNA- *DNA complemento*

c-kit- *gene que codifica a proteína tirosina-quinase recetora CD117*

CRKL- *Crk like proto-oncogene, adaptor protein*

dPCR- *Digital polymerase chain reaction*

DNA- *ácido desoxirribonucleico*

DRM- *doença residual mínima*

ELN- *European Leukemia Net*

EUTOS- *European Treatment Outcome Study*

EUTOS-ELTS- *European Treatment Outcome Study- long-term survival score*

FA- *fase acelerada*

FB- *fase blástica*

FC- *fase crónica*

FISH- *hibridação in situ por fluorescência*

FLT3- *Receptor Tyrosine Kinase 3*

GUSB- *Glucuronidase Beta*

HSP 70, 90 (HOP)-*Proteína de choque térmico 70, 90*

HLA- *(Complexo major de histocompatibilidade) - human leukocyte antigen*

IFN α - interferão alfa

IFZF1- *Ikaros family zinc finger protein 1*

JAK/STAT- *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*

JAK2- *Janus kinase 2*

KRAS- *kirsten rat sarcoma virus*

LLA- Leucemia linfocítica aguda

LMA- Leucemia mieloide aguda

LMC- Leucemia mieloide cr nica

LMMC- Leucemia mielomonocítica cr nica

LNC- Leucemia neutrofílica cr nica

Log- logaritmo

M-CFS- *Macrophage colony-stimulating factor*

M,m, μ - maior, menor, micro

miRNA- micro RNA

mtDNA- DNA mitocondrial

MF- mielofibrose

MO- medula óssea

MPL- *myeloproliferative leukemia protein*

NCCN- *National Comprehensive Cancer Network*

NF- KB- fator nuclear kappa B

NGS- *Next -generation sequencing*

NRAS- *ptoto-oncogene neuroblastoma RAS*

Ph- cromossoma Filadélfia; **Ph +** ou **-** - cromossoma Filadélfia positivo ou negativo

PV- policitemia vera

PDGFRB- *platelet derived growth factor receptor beta*

p190- peso molecular 190 quilodaltons

p210- peso molecular 210 quilodaltons

p230 - peso molecular 230 quilodaltons

OCT-1- *organic cation transporter 1*

OMS- Organização Mundial de Saúde

PI-3K- *phosphatidylinositol- 3 kinase*

RAS/MAPK- Rat sarcoma/ mitogen- activated protein kinase

RCC- Resposta citogenética completa

RHC- Resposta hematológica completa

RLT- Remissão livre de tratamento

RMM- Resposta molecular major

RMP- Resposta molecular profunda

RNA- ácido ribonucleico

RNA_m- ácido ribonucleico mensageiro

RT-PCR- *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR-*quantitative Real Time-Polymerase Chain Reaction*

RUNX1- *RUNX family transcription factor 1*

SCL- *stem cell leucémica*

SI- sistema internacional

SP- sangue periférico

SRC- proto-oncogene, *non-receptor tyrosine kinase*

T(9,22)(q34;q11.2)- translocação entre cromossomas 9 e 22 nas regiões 34 e 11.2 dos braços longos

T315I- substituição de treonina por isoleucina na posição 315

TE- trombocitemia essencial

Tregs- *Regulatory T cells*

TKIs- inibidores da tirosina quinase

VIT B12- cobalamina

Lista de Figuras

FIGURA 1- ESFREGAÇÃO SANGUÍNEO DE UM DOENTE COM LMC	1
FIGURA 2- CARIÓTIPO FEMININO EVIDENTE COM TRANSLOCAÇÃO ENTRE O CROMOSSOMA 9 E 22 SUGESTIVO DE LMC.....	3
FIGURA 3: TRANSLOCAÇÃO RECÍPROCA ENTRE OS CROMOSSOMAS 9 E 22, COM FORMAÇÃO DO CROMOSSOMA FILADÉLFIA.....	5
FIGURA 4- FORMAÇÃO DO ONCOGENE <i>BCR-ABL1</i> PELA TRANSLOCAÇÃO (9,22), DIFERENTES PONTOS DE QUEBRA DOS GENES <i>BCR</i> E <i>ABL1</i> E DIFERENTES TRANSCRITOS RESULTANTES ASSOCIADOS A DIFERENTES FENÓTIPOS DE LMC.	7
FIGURA 5- ESFREGAÇÃO DE ASPIRADO DE MEDULA ÓSSEA COM NUMEROSOS BLASTOS.....	12
FIGURA 6- ESFREGAÇÃO SANGUÍNEO DE DOENTES COM LMC.....	19
FIGURA 7- MEDULA ÓSSEA HIPERCELULAR.....	19
FIGURA 8- TÉCNICA DE FISH COM MÚLTIPLOS SINAIS DE FUSÃO <i>BCR-ABL1</i>	22

Lista de Tabelas

TABELA 1- TIPOS DE LEUCEMIAS MIELOIDES CRÓNICAS.....	2
TABELA 2-VARIANTES MOLECULARES DA PROTEÍNA <i>BCR-ABL</i> , RESPETIVOS <i>BREAKPOINTS</i> , TRANSCRITOS E DOENÇAS ASSOCIADAS.....	8
TABELA 3- DEFINIÇÕES DE FA E FB SEGUNDO A OMS E <i>ELN</i>	13
TABELA 4-PERFIL DO HEMOGRAMA NAS DIFERENTES FASES DA LMC	18
TABELA 5- CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA E REAÇÃO LEUCEMOIDE.....	27
TABELA 6- CARACTERÍSTICAS DA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA, POLICITEMIA VERA, MIELOFIBROSE E TROMBOCITEMIA ESSENCIAL NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL.....	30
TABELA 7-COMPARAÇÃO ENTRE OS DIFERENTES SCORES PRÓGNOSTICOS	34
TABELA 8-RESPOSTA AO TRATAMENTO DA LMC	46
TABELA 9-RECOMENDAÇÕES QUE DEFINEM OS MARCOS DE TRATAMENTO SEGUNDO <i>ELN</i> E <i>NCCN</i> NA LMC	48

1. Introdução

A Leucemia Mieloide Crónica (LMC) é uma neoplasia hematológica sem diferenças raciais ou geográficas significativas¹, caracterizada pela hiperproliferação de células da linhagem granulocítica, sem perda de capacidade de diferenciação e maturação de *stem cells* pluripotentes da MO e de evolução lenta.²

Ocorre por mutação numa *stem cell* da medula óssea (MO), afetando diferentes linhas celulares manifestando-se com extrema leucocitose, imaturidade granulocítica (figura 1), basofilia e eosinofilia; observa-se também com frequência anemia e trombocitose.³ Existem vários tipos de LMC (tabela 1), no entanto, nesta monografia, será essencialmente abordada a LMC Filadélfia positiva (Ph+).

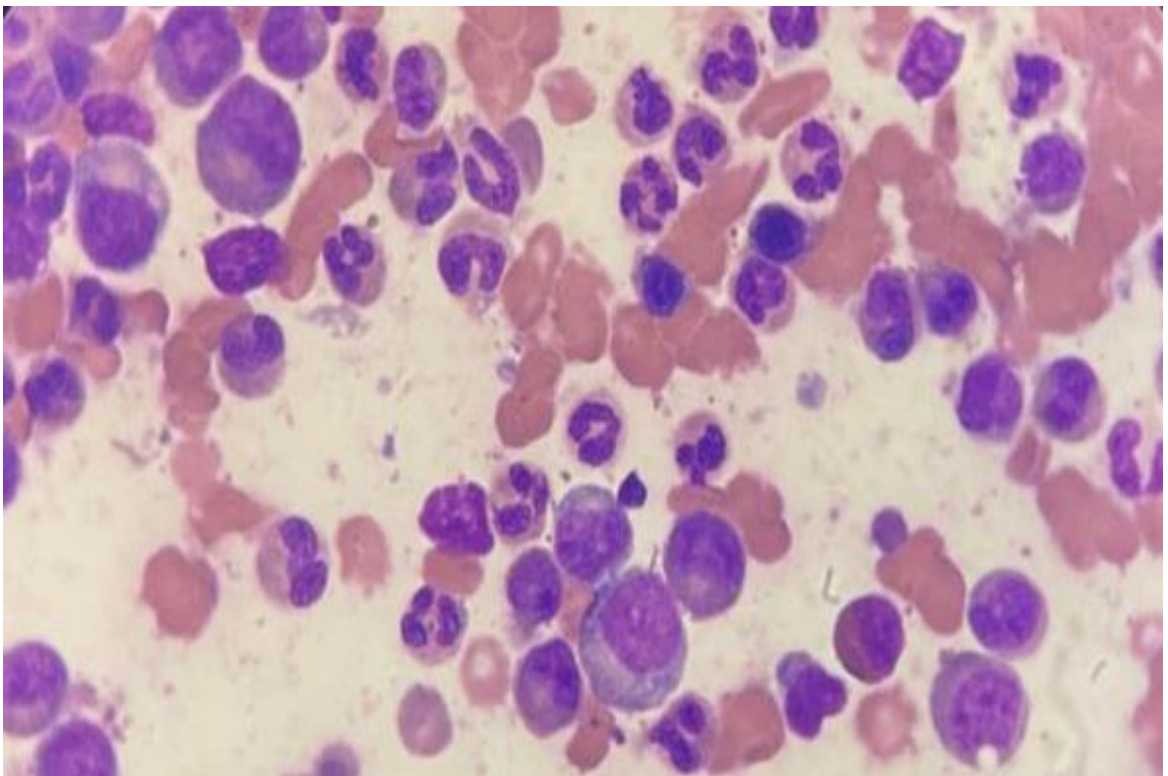


Figura 1- Esfregaço sanguíneo de um doente com leucemia mieloide crónica.
Imagem cedida pelo Dr Carlos Mendes, Diretor do Serviço de Hematologia do IPO.

Tabela 1- Tipos de leucemias mieloides crônicas

LMC Ph+
LMC Ph-
LMC juvenil
Leucemia neutrofílica crônica
Leucemia eosinofílica
Leucemia mielomonocítica crônica
Leucemia monocítica crônica

As primeiras descrições desta doença por Bennett e Virchow datam 1845; à data foram publicados relatos de casos com hepatoesplenomegalia e leucocitose em cadáveres, mas pouco ou nada se sabia sobre essa doença. Passados 2 anos, Virchow aplicou o termo "leukamie" que significa "sangue branco" para indicar a associação com as alterações na hematopoiese,⁴ com produção elevada de glóbulos brancos (GB).

Em 1878 foi proposto por Neumann que, para além do local de produção das células sanguíneas, a MO era também o local de desenvolvimento da doença. Em 1960 foi descrita em pacientes com LMC, a presença de um cromossoma 22 anormal, por Nowel e Hungerford, descoberta esta que marcou o início de uma nova era na Hematologia. Essa anormalidade foi posteriormente identificada como uma translocação entre os cromossomas 9 e 22, em 1973, por Rowley.⁵ Esta foi a primeira descoberta de uma ligação entre a genética e o cancro.⁴

Essa translocação, que origina um cromossoma denominado Filadélfia (Ph) (figura 2), desempenha um papel importante não apenas na patogénese da LMC, mas também no seu diagnóstico, sendo considerado um biomarcador prognóstico da doença.⁶

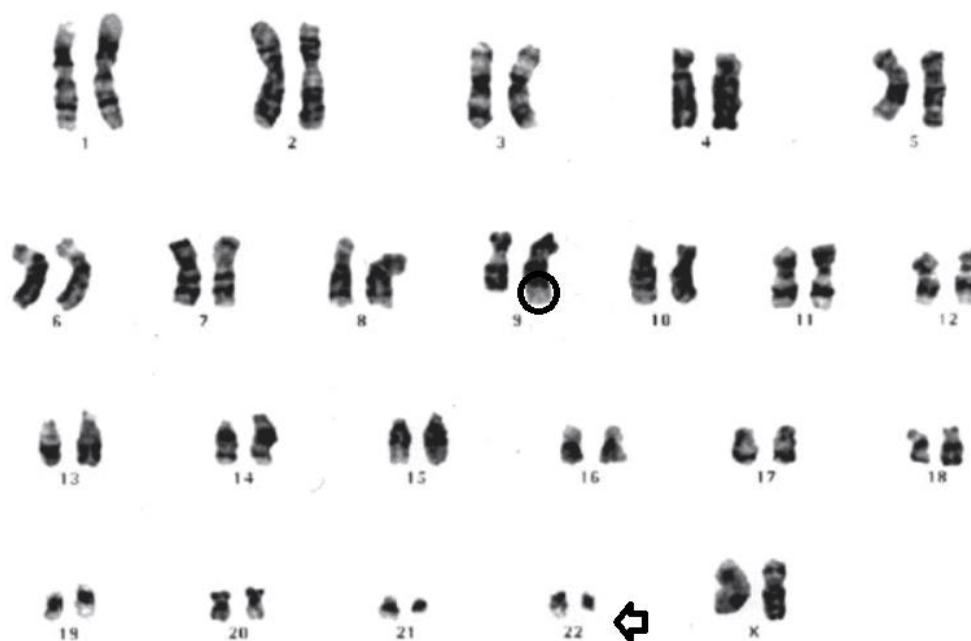


Figura 2- Cariótipo feminino com translocação entre os cromossomas 9 e 22, sugestivo de LMC.

Adaptado de Carvalho et al.,⁷

A introdução de inibidores de tirosina quinase (TKIs, *tyrosine kinase inhibitors*) *BCR-ABL1* revolucionou o tratamento da LMC e iniciou a era das terapias direcionadas em oncologia.

8

Atualmente pacientes com LMC que são adequadamente tratados com TKIs, monitorizados adequadamente e que respondem bem ao tratamento, podem ter uma expectativa de vida quase normal.⁵

Porém, os pacientes podem apresentar efeitos adversos relacionados com os TKIs, como toxicidade em vários órgãos e impacto negativo na qualidade de vida.⁹ Alguns pacientes desenvolvem resistência aos TKIs, o que determina outras opções terapêuticas mais agressivas e de menor sucesso a longo prazo. A LMC pode progredir para uma fase acelerada (FA) ou fase blástica (FB), em que o transplante das *stem cells* é uma opção para estes doentes.¹

As atuais fronteiras de pesquisa desta doença centram-se na superação da resistência aos TKIs, em melhorar o prognóstico para os doentes em FB e o valor das taxas de remissão livre de tratamento (RLT).¹

2. Epidemiologia e etiologia

As taxas de incidência anual de LMC em todo o mundo variam de 0,6 a 2,8 casos por 100.000 indivíduos, com um aumento dos valores com o avanço da idade. A LMC ocorre com maior frequência em homens, do que em mulheres ¹⁰, e é mais frequente em adultos entre os 40 e os 60 anos. ¹¹ Dados obtidos por diferentes fontes revelam que a idade média de diagnóstico é de 64 anos. ¹² Nos países em desenvolvimento, é mais comum o diagnóstico em indivíduos entre os 30 e os 40 anos. ³

Representa cerca de 15% de todas as leucemias e apesar de ser uma doença mais predominante em adultos, há outras faixas etárias que podem ser afetadas ¹³, ocorrendo em menos de 10% de pacientes com idade inferior a 20 anos. ¹⁴ Em crianças representa entre 2-3% das leucemias, sendo mais frequente em crianças com mais de 10 anos, embora também possa ocorrer em crianças com menos de 2 anos de idade. ¹⁵ A incidência anual aumenta com a idade, de <0,1 casos por 100.000 em crianças, para >2,5 casos por 100.000 em idosos. ¹⁶

Em aproximadamente 90% a 95% dos casos, há expressão do cromossoma Ph, produto de uma translocação recíproca dos braços longos dos cromossomas 9 e 22, dando origem ao gene quimérico *BCR-ABL1*. ¹⁷

O risco de desenvolver LMC aumenta com a exposição a altas doses de radiação ionizante e com a história prévia de neoplasias. Na maioria dos casos não é possível identificar a causa da doença. ¹⁷ Não existe uma pré-disposição familiar, nem a contribuição de agentes infecciosos, exposição a agentes químicos ou agentes alquilantes. ¹⁸

Antes do desenvolvimento e instituição da terapia direcionada com TKIs, a sobrevida média era de 5 a 7 anos. ¹⁹ Devido ao sucesso da terapia utilizando TKIs, as taxas de mortalidade diminuíram (até apenas 2-3% por ano) esperando-se um aumento da prevalência da doença. ¹⁶

3. Fisiopatologia e fases da doença

A LMC é caracterizada por uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, com quebra na posição 34 e 11.2, respetivamente, (t (9;22) q34; q11.2) (figura 3) presente nas células hematopoiéticas, e ausente nas restantes células do organismo. Este cromossoma 22 anormal foi visualizado pela primeira vez em Filadélfia (EUA), daí a sua terminologia comum.¹⁹

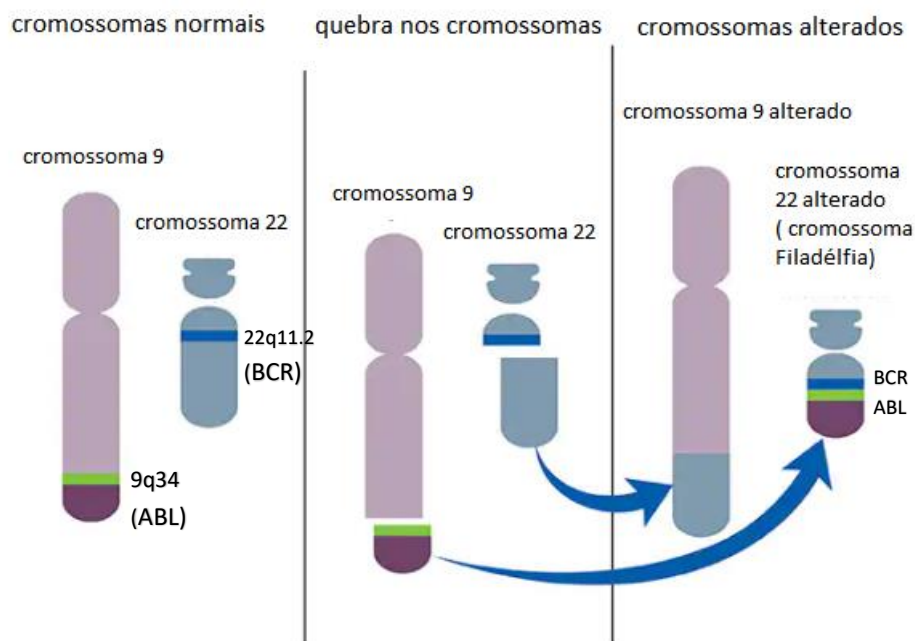


Figura 3- Translocação recíproca entre os cromossomas 9 e 22, com formação do cromossoma Filadélfia.

Adaptado de Mayo clinic ²⁰

Esta anomalia ocorre na célula estaminal pluripotente e observa-se maioritariamente em mielócitos, monócitos e megacariócitos, e menos frequentemente em linfócitos B e T,¹⁷ podendo ser encontrada também em células epiteliais.¹⁶

A proto oncoproteína *ABL1* é uma tirosina quinase expressa e rigidamente controlada em condições normais, que integra sinais de várias fontes extracelulares e intracelulares estando envolvida na regulação do ciclo celular ²¹, cujas funções incluem a inibição da progressão e proliferação do ciclo celular, sinalização de integrinas e reparação da molécula de DNA.¹ A *BCR* é uma quinase com múltiplas funcionalidades, estando

envolvida na sobrevivência da célula, pela ativação do fator de transcrição, fator nuclear kappa B (NF- κ B), na fagocitose e na fosforilação de vários resíduos de tirosina.²²

A fusão de *ABL1* com *BCR* faz com que haja interação com muitas proteínas no citoplasma²³ e ativação de várias vias de sinalização, como *Rat Sarcoma/ Mitogen-activated protein kinase* (RAS/MAPK), *Phosphatidylinositol-3 kinase* (PI-3K), *like proto-oncogene, adaptor protein* (CRKL), *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) e *proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase* (Src), desempenhando um papel importante na transformação e proliferação, redução da apoptose, adesão, migração anormal e instabilidade genética.¹ A fusão resulta na eliminação de um grupo miristoil⁵ que tem uma função autorreguladora, resultando numa tirosina quinase constitutivamente ativada, levando à LMC,²² pela capacidade do gene de fusão *BCR-ABL1* de transformar a *stem cell* hematopoiética num clone neoplásico.²⁴

De uma forma geral, esta translocação recíproca leva à fusão de sequências presentes no gene *ABL1* em 9q34, a jusante do gene *BCR* em 22q11.2, formando um gene de fusão *BCR-ABL1*¹ que posteriormente será transcrito em RNAm *BCR-ABL1* e traduzido numa proteína *BCR-ABL*.¹⁹

O ponto de quebra no cromossoma 9 é relativamente constante entre os exões 1 e 2, enquanto o ponto de quebra no cromossoma 22 pode ocorrer em várias regiões, geralmente da região do ponto de quebra principal (figura 4).⁵

O sequenciamento do gene *BCR* revela a presença de 5 exões (b1-b5) cujos pontos de quebra mais frequentes ocorrem entre b2 e b3 ou b3 e b4.¹⁹ A zona de quebra de *ABL* é geralmente constante e ao nível do segundo exão (a2).²³

Diferentes proteínas de fusão são geradas como consequência dos diferentes pontos de quebra, e a distinção entre esses diferentes pontos de quebra pode ser relevante para características clínico-patológicas específicas, com certas fusões mais características da LMC.²⁵

Podem ser observadas três isoformas relacionadas com os genes híbridos *BCR-ABL1* com atividade anormal, por diferentes fenótipos: p210, p190 e p230 (tabela 2),²¹ respetivamente caracterizados como maior (*M-BCR*), menor (*m-BCR*) e micro (μ -*BCR*).

Todas as três proteínas de fusão *BCR-ABL* contêm os domínios *ABL1* comuns.²² Até ao momento não há uma elucidação clara de como esses diferentes fenótipos refletem diferentes processos de LMC.⁶

Subtipos de transcrição e13a2 (b2a2) e e14a2 (b3a2), que codificam p210, são vistos em aproximadamente 98% de todos os casos de LMC. A transcrição e1a2 que codifica para p190 raramente está presente (aproximadamente 1%) na LMC. O raro e19a2 (p230) foi descrito em uma pequena fração de pacientes com LMC que frequentemente apresentam maturação neutrofílica ou trombocitose.²²

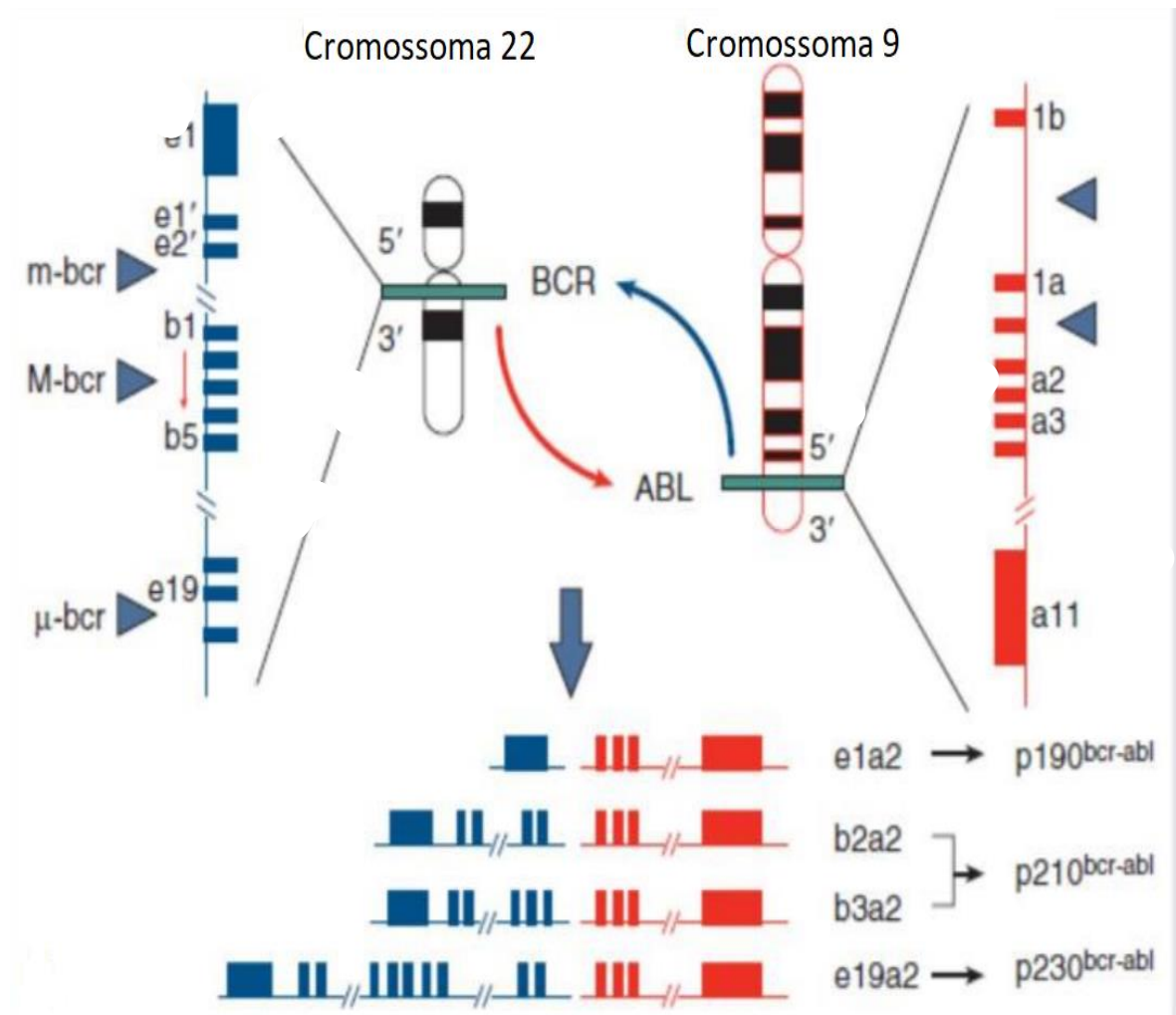


Figura 4- Formação do oncogene *BCR-ABL1* pela translocação (9,22), diferentes pontos de quebra dos genes *BCR* e *ABL1* e diferentes transcritos resultantes associados a diferentes fenótipos de LMC.

Adaptado de A.Bonfim et al.,²⁶

Tabela 2-Variantes moleculares da proteína *BCR-ABL1*, respetivos *Breakpoints*, transcritos e doenças associadas.

PROTEINA	BREAKPOINT	TRANSCRITOS	DOENÇA ASSOCIADA
<i>P210BCR-ABL1</i>	<i>M-BCR</i>	b2a2 e b3a2	Maioria dos casos são LMC. Pode ser encontrada em situações de LLA-B
<i>P190BCR-ABL1</i>	<i>m-BCR</i>	e1a2	Minoria dos casos são LMC. Maioria dos casos são LLA-B. Casos raros de LMA
<i>P230BCR-ABL1</i>	μ - <i>BCR</i>	e19a2	LNC, raros casos de LMC

LLA-B, leucemia linfóide B aguda; LMA, leucemia mieloide aguda; LMC, leucemia mieloide crónica; LNC, leucemia neutrofílica crónica; *M-BCR*, *major breakpoint cluster region*; *m-BCR*, *minor breakpoint cluster region*; Ph, cromossoma Filadélfia; μ -*BCR*, *micro breakpoint cluster region*.

Adaptado de Deininger MWN ²¹

A presença da translocação *BCR-ABL1* numa célula hematopoiética não é por si só suficiente para causar leucemia porque os transcritos de fusão *BCR-ABL1* do tipo *M-BCR* e *m-BCR* são detetáveis em baixa frequência no sangue de muitos indivíduos saudáveis.²¹

Podem ser categorizadas as seguintes alterações moleculares na LMC: aumento do nível de expressão de *BCR-ABL1*; ativação oncogénica ou amplificação de proto-oncogenes em *RUNX family transcription factor 1 (RUNX1)*, neuroblastoma RAS (NRAS), *kirsten rat sarcoma vírus (KRAS)*; mutações da perda de função de genes supressores de tumor como o p53; expressão ou funções suprimidas em alguns genes importantes para diferenciação e também mutações em genes importantes para a regulação epigenética.²³

Como já foi referido, entre os efeitos celulares gerados por esse processo neoplásico, estão o aumento do número de espécies reativas de oxigénio, quebra e reparação deficiente da fita de DNA, desregulação do ciclo celular e da adesão celular, inibição da apoptose e autofagia.²¹ *BCR-ABL1* também ativa o MYC, que está relacionado com a resistência a fármacos, síntese de DNA e instabilidade genómica.²³

A proliferação contínua de *stem cells* com alta capacidade de diferenciação, favorece o aparecimento de mutações adicionais ao cromossoma Ph, que podem conferir resistência ao tratamento padrão, com impacto negativo no prognóstico,²⁷ uma vez que essas alterações podem tornar o sítio inicialmente mutado mais suscetível a novas mutações, facilitando a progressão da doença. Pacientes com LMC, na maioria, apresentam uma única mutação, representada pelo cromossoma Ph e, à medida que a doença progride, as taxas de alterações cromossômicas adicionais tornam-se maiores (30% -70%).²³

Alterações cromossômicas adicionais (ACAs) refletem a possível instabilidade cromossômica, com 10% de prevalência relatada em pacientes em FC, aumentando para 30% e 90% em FA e FB, respectivamente. A instabilidade genômica tem sido associada a um risco aumentado de falha no tratamento, progressão leucêmica e diminuição da sobrevida.²⁸ Essas ACAs incluem monossomia 7, trissomia 8, trissomia 21, perda do cromossoma X nas mulheres e perda do cromossoma Y nos homens, que indicam mau prognóstico e predizem alterações hematológicas e patológicas.⁶ ACAs aparecem principalmente nos estádios mais graves da LMC e podem levar ao diagnóstico de novas características da LMC, pelo que é de extrema importância compreender melhor o seu efeito no paciente e o seu valor prognóstico.⁶

Fases da LMC

A LMC é uma doença mieloproliferativa que pode apresentar uma FC, seguida de uma FA e depois uma FB.²³ A progressão nas 3 fases distintas é caracterizada pelo agravamento do quadro clínico e das características laboratoriais. É importante referir que nem sempre os pacientes vão passar por uma ordem sequencial das fases, podendo progredir da FC para FB bruscamente sem ter uma fase intermédia.⁸ A transformação de FC para FB era comum na era pré-TKI, mas hoje em dia é rara em pacientes com acesso a tratamento adequado.¹

Os níveis aumentados de *BCR-ABL* não são suficientes para explicar as mudanças nas fases da LMC, mas sabe-se que a evolução da FC para outros estádios da doença pode ser uma consequência da instabilidade genética e evolução clonal, com alterações cromossômicas adicionais resultantes da proliferação celular induzida pelo gene *BCR-ABL1*. Assim, alterações secundárias e mutações adicionais têm sido estudadas para explicar a progressão da doença.²⁹

De facto, as alterações moleculares adicionais surgem frequentemente associadas à transformação para a FB ou FA. Outras mutações, em *addition sex combs like 1 (ASXL1)*, *Ikaros family zinc finger 1 (IKZF1)* e *RUNX family transcription factor 1 (RUNX1)*, têm sido identificadas em alguns pacientes.⁵

A LMC não tratada ou que não responda ao tratamento, evolui frequentemente para leucemia aguda – crise blástica. Cada uma das fases apresenta sintomatologia e achados clínicos e laboratoriais distintos.

3.1-Fase crónica

A maioria dos pacientes são diagnosticados na FC, frequentemente assintomática e associada a melhor prognóstico. Esta fase pode durar vários anos, mas em média persiste por um período de 3 a 5 anos. No diagnóstico, cerca de 90% dos doentes encontram-se nesta fase, e destes, 20 a 40% são assintomáticos, sendo identificados pela leucocitose detetada num exame de rotina.³⁰

É caracterizada por uma hiperplasia da MO com aumento do número de células mieloides diferenciadas sem bloqueio de maturação; nas fases avançadas da doença, já se observa um bloqueio na diferenciação, com acumulação de blastos, de células hematopoiéticas normais, especialmente linfócitos.¹⁷ Nesta fase as células leucémicas são minimamente invasivas e principalmente confinadas ao sangue, MO, baço e fígado.¹⁶

3.2-Fase acelerada

A FA corresponde a uma fase de transição da doença e apresenta uma perda progressiva da diferenciação celular. Apresenta um prognóstico intermédio, que melhorou substancialmente com a introdução dos TKIs.⁵

É caracterizada pelo aumento do número de blastos na MO e no SP, além de leucocitose, basofilia, anemia e alteração do número de plaquetas. Na maioria dos casos existe um agravamento significativo no estado clínico, com aparecimento ou agravamento dos

sintomas. A MO pode apresentar displasia nas linhagens granulocítica e megacariocítica e pode ser notória a presença de fibrose.¹⁷

3.3-Fase blástica

Esta fase da LMC assemelha-se à leucemia mieloide aguda (LMA) ou, menos frequentemente, à leucemia linfóide aguda (LLA). Acredita-se que a fase aguda resulte de instabilidade genética adicional e aquisição de mais mutações causadas de alguma forma pela atividade de *BCR-ABL1*.³¹

Esta transformação da LMC para um quadro de leucemia aguda é um período de fácil identificação.¹⁹ Quando não tratada ou na ausência de resposta ao tratamento, eventualmente progride para esta fase, resultando numa proliferação descontrolada, perda de diferenciação e perda de resposta aos mecanismos normais de controle, mesmo após a utilização de TKIs.³¹

É definida hematologicamente pelo aumento do número de blastos leucémicos mielóides e ou linfóides (>20%) no sangue periférico. Pode ser rapidamente fatal com pouco sucesso terapêutico, agravamento dos sintomas, hemorragias, febre e aparecimento de infeções.³²

Cerca de 25% dos pacientes adquirem a forma linfóide aguda, enquanto 75% adquirem a forma mieloide, sendo rara a forma bifenotípica.¹⁷

Esta fase é caracterizada pelo aumento rápido de blastos e falência medular que resulta de uma proliferação descontrolada de precursores, habitualmente mielóides, não acompanhada de diferenciação e maturação. Morfologicamente, não é possível distinguir esta fase blástica da LMC da leucemia aguda.³ Os blastos podem estar presentes no baço, fígado, linfonodos, pele e tecidos moles.¹⁶

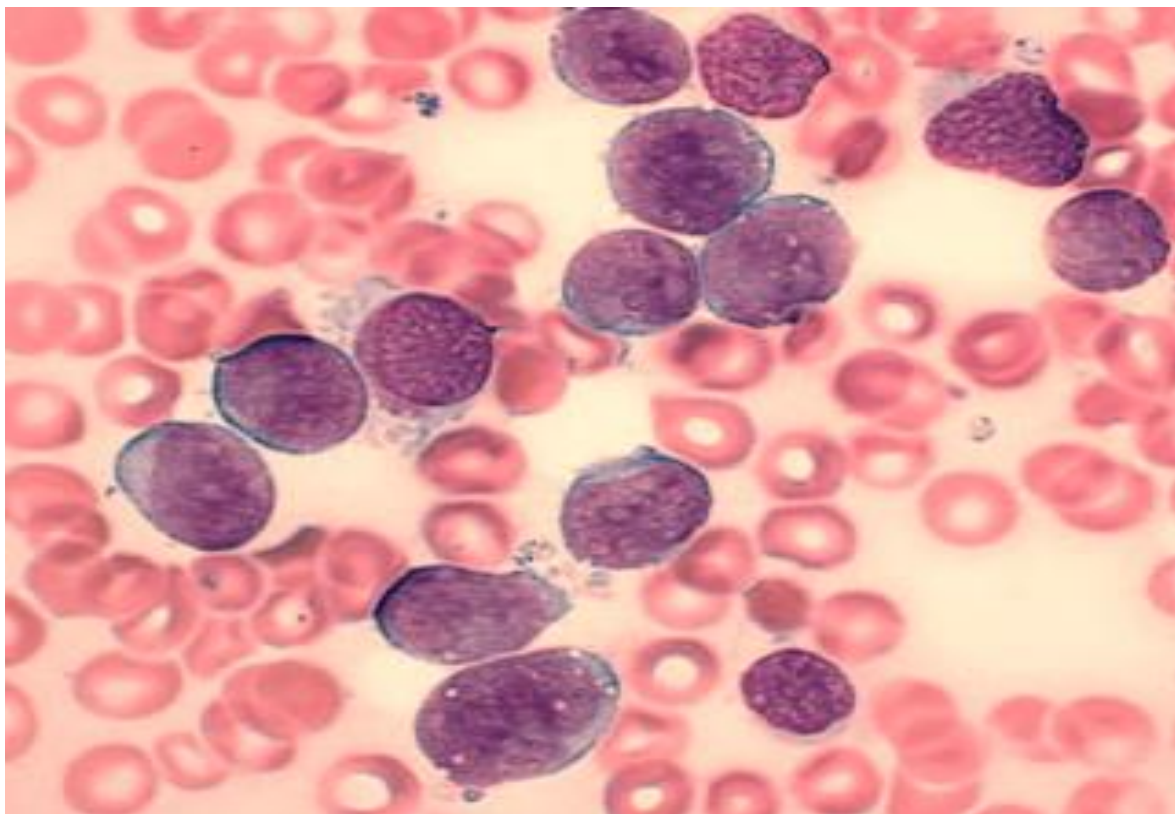


Figura 5- Esfregaço de aspirado de medula óssea com numerosos blastos. Coloração com wright-Giemsa.

Adaptado de Vardiman ³³

É frequente encontrar alterações citogenéticas adicionais, sendo comum a duplicação do cromossoma Ph, trissomia 8 e 17q. Fatores genéticos e modificações epigenéticas (como modificadores de histonas, metilação do DNA e miRNA desregulados) são cada vez mais reconhecidos como mecanismos cruciais na patogénese e progressão da doença.³⁴

As definições de FA e FB são amplamente dependentes da proporção de blastos no sangue e na MO, mas variam nos dois sistemas mais usados (OMS e *European Leukemia Net (ELN)*) (tabela 3). A maioria dos estudos recentes de TKI adotaram os critérios da *ELN*.¹⁹

Tabela 3-Definições da FA e FB na LMC segundo a OMS e ELN.

		Baço	Leucócitos	Blastos *	Basófilos*	Plaquetas	Acas/Ph+	Envolvimento extramedular**
Fase acelerada	ELN	-	-	15% - 29%	≥ 20%	<100x10 ⁹ /L (não relacionado com terapia)	Presente	-
	OMS	Esplenomegalia (pré-existente ou que não responde ao tratamento)	>10x10 ⁹ /L (pré-existente ou que não responde ao tratamento)	10% - 19%	>20%	>1000x10 ⁹ /L (insensível à terapia) ou <100x10 ⁹ /L (não relacionado com terapia)	Presente	-
Fase blástica	ELN	-	-	≥ 30%	-	-	-	Presente
	OMS	-	-	≥ 20%	-	-	-	Presente

*Blastos/ * basófilos no sangue periférico ou medula

**Envolvimento extramedular- nódulos linfáticos, pele, SNC, osso e pulmão

OMS, organização mundial de saúde, *ELN, European Leukemia Net*, ACAS/Ph+ anomalias citogenéticas clonais em células Ph

Adaptado de Apperley JF ¹⁹

4. Sinais e Sintomas

O quadro clínico da LMC é muito heterogêneo e numa fase inicial os sintomas podem ser bastantes discretos. As manifestações clínicas vão depender da fase e gravidade da doença.³⁵

Os primeiros sinais da doença na FC estão associados à proliferação descontrolada das células na MO e sua libertação para o sangue periférico (SP); observa-se leucocitose com desvio à esquerda, com prevalência de precursores granulocíticos mais maduros como mielócitos e metamielócitos, (sem obedecer a uma ordem de maturação para a libertação destas células pela MO)¹⁷ MO hiper celular, anemia (dispneia, tonturas, fadiga) e disfunção plaquetária com eventual aumento do valor de plaquetas (hemorragia e complicações trombóticas).¹ Achados comuns na apresentação incluem fadiga, mal-estar, perda ponderal, suores noturnos e anemia; cerca de 50% dos pacientes têm esplenomegalia palpável.¹⁶

Podem aparecer equimoses e febre. A ocorrência de hemorragia e complicações trombóticas pode ser observada em menos de 5% dos casos na fase crónica.¹

Os doentes podem apresentar hepatoesplenomegalia, que resultam numa sensação de plenitude abdominal, com desconforto e saciedade precoce¹⁷; embora podem apresentar linfadenopatia.

Pode ocorrer envolvimento cardíaco, que mais comum, com possibilidade de necrose, fibrose endomiocárdica, insuficiência cardíaca congestiva, insuficiência valvular e trombose venosa; a nível neurológico, pode ocorrer disfunção cognitiva e neuropatia periférica; também pode haver envolvimento pulmonar, com manifestação de tosse; envolvimento cutâneo com evidência de angiodema, pápulas, nódulos, urticária; envolvimento gastrointestinal, intraocular; reumático e renal.³⁶

Pode ocorrer síndrome de hiperviscosidade decorrente da hiperleucocitose, com sangramentos na mucosa¹⁷; até 5% dos pacientes podem apresentar sintomas de hiperviscosidade, incluindo priapismo.²⁰

A esplenomegalia está presente em 46% a 76% dos casos e na fase acelerada os doentes apresentam esplenomegalia mais acentuada (primeira manifestação da fase acelerada). Na fase blástica da doença ocorre envolvimento de tecidos extramedulares como gânglios linfáticos, tecidos moles e pele.³

5. Diagnóstico laboratorial

Para estabelecer o diagnóstico de LMC deve ser feita uma avaliação clínica e laboratorial extensa, que inclui: realização de hemograma completo, mielograma e eventualmente biopsia, *RT-PCR* (para identificação do transcrito *BCR-ABL1*)³⁴, citogenética convencional e citogenética molecular (FISH) para t(9;22)(q34;q11.2). A realização da técnica de FISH e *RT-PCR* podem ser realizados a partir de SP.²⁰

É de extrema importância considerar também estudos bioquímicos, que ajudam ao diagnóstico. Na FC, há necessidade de estabelecer o diagnóstico diferencial entre LMC, síndromes mieloproliferativas e reações leucemóides¹⁷ (abordado posteriormente).

A coloração citoquímica para a fosfatase alcalina, já foi muito utilizado no diagnóstico desta patologia, mas com o desenvolvimento de novas ferramentas, como as análises citogenéticas e moleculares, encontra-se em desuso.¹⁰

Na maior parte dos casos de LMC, há presença do cromossoma Ph ou do seu transcrito *BCR-ABL1*, que é determinante para o diagnóstico da doença.^{17, 24} Atualmente sabe-se que o cromossoma Ph não é restrito à LMC, é um importante marcador citogenético e a sua detecção tem implicações no diagnóstico, prognóstico e terapêutica da doença.^{8, 37}

O CD26 foi identificado como um potencial biomarcador para o isolamento de *stem cells* leucémicas (SCL) em amostras de MO de casos de LMC, uma vez que é expresso especificamente em todas as células leucémicas de pacientes com LMC, mas não está presente em células normais de MO ou em células leucémicas de outras neoplasias.³⁸

5.1 -Hemograma

A maior parte dos pacientes já apresenta sintomas ao diagnóstico, com a doença já estabelecida. No entanto, um número cada vez maior de pacientes assintomáticos é

diagnosticado em exames de rotina, através do hemograma, o qual permite definir a fase de evolução da doença (tabela 4).³⁴

Na LMC as alterações ao hemograma completo são as seguintes na fase crónica:

- Leucocitose ($> 80 \times 10^9/L$) com desvio à esquerda apresentando hiato leucémico (mais mielócitos que metamielócitos)². As células da linhagem neutrofílica estão aumentadas, com “picos” para os mielócitos e neutrófilos segmentados. Nas crianças é frequente observarem-se valores de leucócitos superiores ao dos adultos ($\sim 250 \times 10^9/L$).¹⁶
- A basofilia absoluta é quase universal, com eosinofilia absoluta em 90% dos casos.²
- A monocitose é frequentemente observada e a monocitose absoluta é mais proeminente nos casos incomuns com p190 *BCR-ABL*.²
- Os linfócitos estão aumentados por aumento de células T helper e T supressoras; os linfócitos B não costumam estar elevados.³
- A contagem de plaquetas é normal ou elevada; a trombocitopenia sugere um diagnóstico alternativo ou a presença de doença em estado avançado.²
- Anemia que pode ser discreta ou acentuada, dependendo da evolução da doença.¹⁷ Geralmente é uma anemia normocrómica normocítica, podendo observar-se eritroblastos no SP.³

Na FA, as alterações ao hemograma de doentes com LMC revelam um aumento da leucocitose ($> 100 \times 10^9/L$) com aumento da percentagem de blastos (entre 10-19%) e basofilia ($> 20\%$); a anemia agrava-se, com poiquilocitose, anisocitose e anisocromia; relativamente às plaquetas, pode ocorrer trombocitopenia não relacionada com a terapia ou trombocitose no caso de não resposta ao tratamento.

Já na FB, é notória leucocitose, com um aumento da percentagem de blastos (superior a 20%), diminuição do número de mielócitos; hipossegmentação dos neutrófilos e presença

de basofilia; relativamente ao eritrograma é evidente uma anemia com poiquilocitose, anisocitose e anisocromia e presença de eritroblastos. Relativamente à contagem de plaquetas, pode observar-se trombocitopenia ou trombocitose.

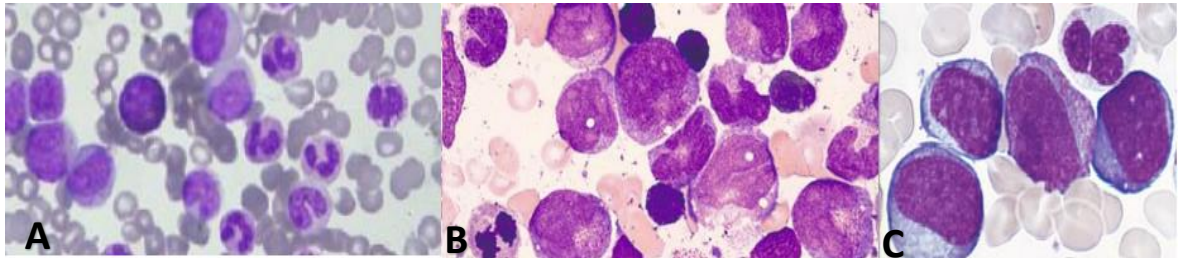


Figura 6- Esfregaços sanguíneos de doentes com LMC.

A) Esfregaço sanguíneo em doente com fase crónica; B) esfregaço sanguíneo em doente com Fase acelerada ; C) esfregaço sanguíneo de doente em fase blástica.

Adaptado de Hoffbrand, A. V. et al. ³⁹

A realização do hemograma com observação do esfregaço sanguíneo são ferramentas importantes para a identificação da LMC, e a sua correta interpretação torna-se essencial para direcionar o diagnóstico.³⁴

Tabela 4-Perfil do hemograma nas diferentes fases da LMC

	Parâmetro analisado	Valores encontrados
FC	<u>Leucograma</u>	
	Contagem de leucócitos	Leucocitose ($\geq 80 \times 10^9/L$) com desvio á esquerda
	Contagem diferencial	Predomínio de neutrófilos e mielócitos, valores mais baixos de metamielócitos; raros promielócitos; até 10% de blastos, valores elevados de basófilos e eosinófilos
	Eritrograma	Anemia normocítica e normocrômica; presença de eritroblastos
	Plaquetas	Valor normal ou aumentado
FA	<u>Leucograma</u>	
	Contagem de leucócitos	Leucocitose crescente ($>100 \times 10^9/L$)
	Contagem diferencial	Aumento de blastos (10 a 19%) Aumento de basófilos ($\geq 20\%$)
	Eritrograma	Anemia agravada com poiquilocitose, anisocitose e anisocromia
	Plaquetas	$< 100 \times 10^9 /L$ ou $> 1.000 \times 10^9 /L$
FB	<u>Leucograma</u>	Leucocitose, diminuição do número de mielócitos;
	Contagem diferencial	hipossegmentação dos neutrófilos e presença de basofilia blastos ($>20\%$)
	Eritrograma	anemia com poiquilocitose, anisocitose e anisocromia; presença de eritroblastos.
	Plaquetas	Trombocitopenia ou trombocitose

FC, fase crónica; FA, fase acelerada; FB, fase blástica

Adaptado de Sossela,FR ¹⁷

5.2-Exame morfológico da medula óssea

Embora o diagnóstico da LMC possa ser feito no SP, pode ser necessária uma aspiração da MO (e possível biópsia) para fazer o estadiamento da doença e avaliar alterações cromossômicas adicionais.⁵ É realizado também no caso da quantidade disponível de leucócitos ser reduzida.¹⁷

O exame morfológico mostra uma medula hipercelular (figura 7) devido à intensa proliferação de células granulocíticas, com células em todas as fases de maturação com predominância mieloide,¹ com tecido hematopoiético a ocupar 75-90% do volume.³ A sequência de maturação é mantida, mas com predomínio de células mais jovens como mielócitos.¹⁷

Pode ser observada ainda proliferação de megacariócitos, com diferentes graus de fibrose reticulínica e vascularização.¹⁷ Podem observar-se também pseudocélulas de Gaucher (grandes macrófagos com citoplasma espumoso e núcleo excêntrico lobulado) e eventualmente células Harlequin (eosinófilos displásicos com grânulos metacromáticos). A fibrose de reticulina pode estar presente em grau 1-2, mas a fibrose grave não é comum.

1

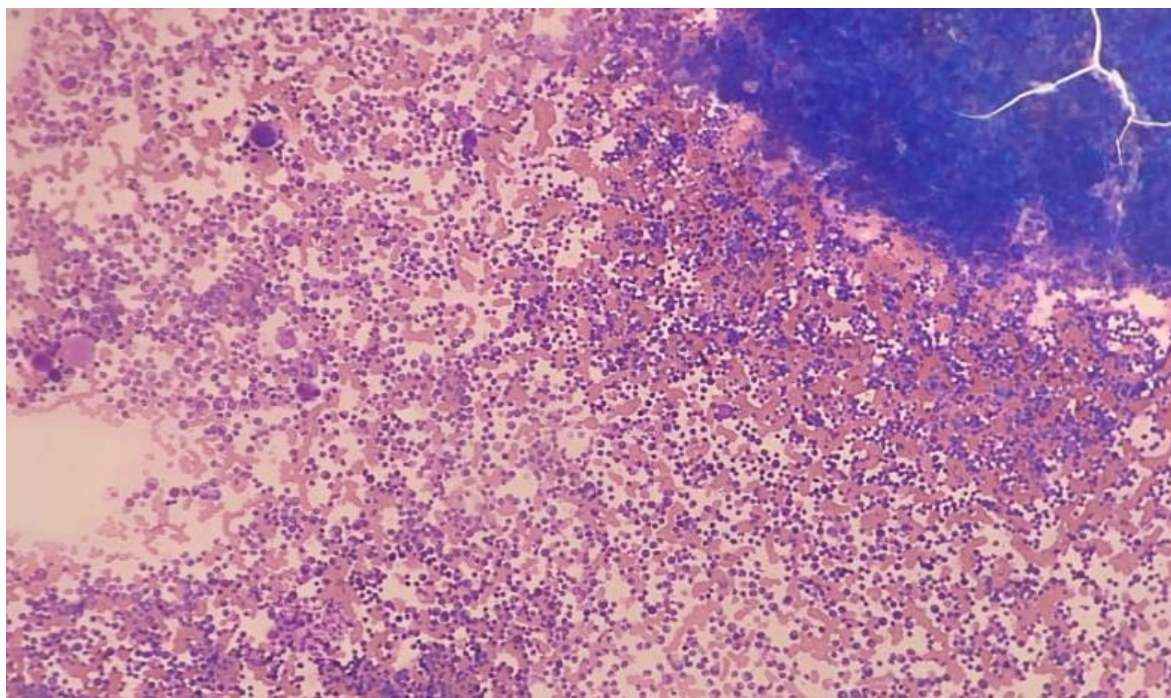


Figura 7- Medula óssea hipercelular, granulocitopoiese intensa e megacariocitose. Imagem cedida pelo Dr Carlos Mendes, Diretor do Serviço de Hematologia do IPO.

O aspirado de MO e biópsia com citogenética convencional e/ou citogenética molecular e citometria de fluxo são essenciais no momento do diagnóstico, para excluir doença em estado avançado (FA ou FB) e detetar casos raros com transcritos *BCR-ABL1* alternativos não detetado em exame de rotina.² A citometria de fluxo identificará casos com progressão não reconhecida para crise blástica linfóide, pelas suas características fenotípicas. A cariotipagem convencional pode identificar alterações citogenéticas adicionais (evolução clonal citogenética).²⁰

5.3-Análise citogenética

A análise citogenética é um dos ensaios mais importantes para detetar o cromossoma Ph e deve ser sempre feita no momento do diagnóstico para confirmar a sua presença, assim como a presença de ACAs,⁵ especialmente no caso de evolução clonal nos clones Ph negativo/ positivo (durante a terapia), que podem em casos raros evoluir para síndrome mielodisplásica ou mesmo para leucemia mieloide aguda.²⁵

A presença da translocação t (9,22) confirma o diagnóstico, enquanto as ACAs indicam progressão da LMC.⁴⁰

A citogenética convencional apresenta limitações, como a baixa sensibilidade, atrasos no diagnóstico pela falta de células neoplásicas em divisão, dificuldade em obter aspirados medulares adequados e necessidade de células em metáfase; que dificultam a deteção de alterações cromossómicas pela análise de rotina de 20-25 metáfases.²⁵ Apesar das desvantagens, a citogenética é a técnica de referência padrão¹⁷ e deve ser realizada rotineiramente, especialmente no diagnóstico, para detetar diversas alterações.⁴¹

O *BCR-ABL1* pode estar presente sem ser detetável por citogenética convencional.¹⁷ Nesta situação pode ser identificado por citogenética molecular, utilizando a técnica de FISH, *RT-PCR* ou ambos, que não só confirma o diagnóstico, como permite perceber em que fase está a doença e, por consequência, o prognóstico da mesma.⁵

5.3.1-Técnica de FISH

Ao contrário da citogenética convencional, a citogenética molecular baseia-se na marcação de segmentos de cromossoma ou cromossomas através de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (figura 7). Assim, o gene de fusão *BCR-ABL1* pode ser identificado usando marcadores cromossômicos específicos, sendo esta técnica muito utilizada em doenças hematológicas, para identificar com maior rapidez as alterações genéticas, dando um diagnóstico mais preciso quando comparando à citogenética convencional.⁵

A técnica de FISH pode ser realizada em células em divisão e não divisão, da MO e SP⁴¹ para avaliar o número de células positivas para *BCR-ABL1*.⁵ É realizada em núcleos interfásicos para detetar *BCR-ABL1* no diagnóstico, especialmente quando a citogenética convencional é negativa ou quando nenhuma célula metafásica pode ser obtida.²⁵

A comparação de amostras simultâneas de MO e SP por análise de FISH mostra alta concordância. Os estudos por FISH podem ter uma faixa de falsos positivos de 1 a 10%, dependendo das sondas utilizadas.⁴²

Para a identificação de ACAs, são necessárias sondas específicas para cada alteração investigada e, embora não seja tão sensível quanto a *PCR*, pode ser importante em casos de transcrições atípicas.⁵

Como o diagnóstico genético da LMC é baseado em análises citogenéticas e de biologia molecular, primeiro, deve incluir a demonstração do cromossoma Filadélfia (cariótipo executado a partir de SP ou MO) e/ou do rearranjo *BCR-ABL1* por FISH, apesar de em mais de 95% dos casos de LMC, o cromossoma Ph poder ser demonstrado por cariótipo convencional. Em casos de LMC (Ph+), a técnica de FISH revela um rearranjo entre os genes *BCR* e *ABL1*.⁴³

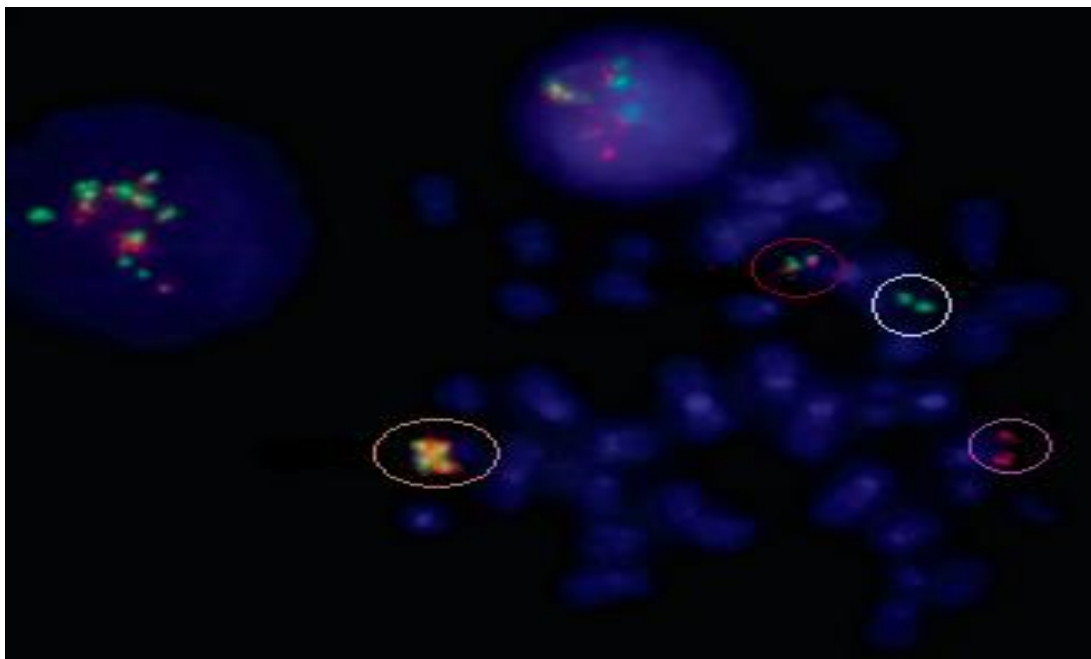


Figura 8- Técnica de FISH mostrando a amplificação de múltiplos sinais de fusão *BCR-ABL1*. Os 2 círculos à esquerda evidenciam a fusão *BCR-ABL1*, enquanto os 2 círculos à direita evidenciam o par de cromossomas 22 (verde) e cromossomas 9 (vermelho).

Adaptado de Vardiman JW ³³

5.4-Testes moleculares

Como mais de 95% dos pacientes com LMC são Ph+ e cerca 5% dos pacientes tem um Ph silencioso que não pode ser identificado pelo cariótipo, pode recorrer-se a testes moleculares para estabelecer o diagnóstico.¹

A análise qualitativa da transcrição de *BCR-ABL1* (*RT-PCR*) deve ser seguida por análise quantitativa de reação em cadeia da polimerase em tempo real (*RT-qPCR*) antes do início da terapia, para determinar o valor de base dos transcritos de *BCR-ABL1*, de acordo com a *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*.⁴⁴

A *PCR* qualitativa é útil para detetar *BCR-ABL1*, e identificar o tipo de rearranjo; no entanto, o tipo de proteína codificada ainda não tem valor na prática clínica, nem influencia a escolha da terapia de primeira linha.²⁴

5.4.1-Rt-PCR

É uma análise sensível, rápida quando comparada com técnicas de citogenética e *PCR* convencionais. Corresponde a uma alternativa à técnica de FISH, para identificar mRNA *BCR-ABL1* em pacientes com suspeita de LMC que são Ph- por citogenética convencional.¹ Há casos em que não é possível detetar o cromossoma Ph, pois o oncogene pode estar localizado no cromossoma 9- cromossoma Filadélfia “mascarado”.²⁵

O teste de *PCR* qualitativo fornece informações sobre a presença do transcrito *BCR-ABL* e consegue detetar quase todos os tipos de transcritos *BCR-ABL* na fase de diagnóstico. Estabelece o perfil das configurações moleculares, utilizando como amostra SP, evitando repetidas aspirações da MO.⁴⁵

O teste *PCR* também pode ser quantitativo, em que a quantidade de *BCR-ABL1* é avaliada. É medida a percentagem real de transcritos de mRNA de *BCR-ABL1*, com uma correlação significativa entre os resultados obtidos a partir de SP e de MO.²²

Nesta técnica, após isolamento de RNA total de leucócitos de SP e transcrição reversa (RT) de RNA para cDNA, o número absoluto de cópias do transcrito alvo, juntamente com o transcrito do gene de controle (necessário para corrigir diferenças na quantidade e qualidade de RNA e eficácia entre amostras), são determinados, com utilização de curvas de calibração de plasmídeo. Os resultados são expressos como uma razão percentual entre a soma das cópias *BCR-ABL1* e a soma das cópias do gene de controlo (CG) entre as réplicas (normalmente duas réplicas; alguns laboratórios utilizam três réplicas e outros utilizam uma única medição). Os CG recomendados são *ABL*, *BCR* ou *GUSB*.⁴⁶

A *PCR* qualitativa é útil para diagnosticar a LMC. A *PCR* quantitativa é ideal para monitorar a doença residual⁴² (abordado no subtema monitorização).

Pelo menos um teste *PCR* qualitativo para *BCR-ABL1* é recomendado para confirmar a transcrição. Transcritos como e13a3, e14a3 ou e19a2 não podem ser detetados pelo *PCR* padrão.⁵

Para melhorar a relevância das técnicas de *RT-PCR*, vários métodos, incluindo o *RT-PCR* multiplex, foram desenvolvidos para detetar as variantes *BCR-ABL1* em pacientes com

LMC.²⁵ No entanto, há outras técnicas que podem ajudar no diagnóstico da LMC, como a *Ngs*.

5.4.2-*Ngs*

A *next generation sequencing (Ngs)* é cada vez mais usada na LMC ⁵. É uma técnica promissora que poderá melhorar o diagnóstico de LMC, sendo capaz de detetar variantes de transcritos *BCR-ABL1* e mutações resistentes a TKIs. Enfrenta obstáculos para a sua implementação, pelos custos elevados e tempo elevado de execução. ⁴⁷

Poderá ser útil nos casos em que não há resposta ao tratamento com TKIs, permitindo a otimização da terapia antes que a LMC evolua para FB.⁴⁸ Com a redução de custos, estudos adicionais e a sua implementação na prática clínica, espera-se que a *Ngs* auxilie no diagnóstico e terapia da LMC, e que permita avançar no desenvolvimento de medicamentos para pacientes sem resposta terapêutica.⁴⁹

A *Ngs* permite a identificação de qualquer mutação no domínio *ABL1*, mesmo em níveis subclonais ²⁴ e, comparado ao sequenciamento Sanger convencional, com um limite de sensibilidade de aproximadamente 10% a 20%, o sequenciamento por *Ngs* mostrou uma sensibilidade de 1-15%.⁴¹

5.4.3-Western blot

A proteína *BCR-ABL* também pode ser demonstrada por *western blot*, mas esta análise não se enquadra nos testes de rotina, bem como em protocolos para estudar a atividade da tirosina quinase da oncoproteína *BCR-ABL*.⁴³

5.4.4- Citometria de fluxo para imunofenotipagem

Dados imunofenotípicos na FC sugerem que a expressão de CD7 em células CD34-I- têm prognóstico adverso, enquanto uma população normal de células-tronco CD34-I, sem expressão de marcadores anormais (por exemplo, CD7, CD56, ou GDI 1b), prevê uma melhor resposta à terapia com TKI. No entanto, o principal papel da imunofenotipagem na LMC é a avaliação dos blastos na fase blástica, que tem diferentes atividades de

mieloperoxidase.¹⁶ Como foi referido anteriormente, é possível identificar o antígeno CD26 (potencial biomarcador para o isolamento de SCL) em amostras de MO em casos de LMC, recorrendo à citometria de fluxo.

5.5-Achados bioquímicos

Como foi referido anteriormente, para além dos achados hematológicos e citogenéticos, é possível observar alterações a nível bioquímico na LMC. A hiperproliferação celular e destruição celular, bem como a leucocitose com predominância de células granulocíticas explicam a maioria dos achados bioquímicos na LMC:

- O valor de ácido úrico aumenta (que pode ser 3 vezes superior ao valor normal), observando-se hiperuricemia e hiperuricosúria em doentes não tratados.
- Aumento dos níveis da vitamina B12 sérica (até 10 vezes superiores ao normal).
- Aumento de transcobalaminas (produzidas pelos neutrófilos, que estão aumentados nestes doentes).
- Níveis circulantes de histamina aumentados (100 vezes superiores ao normal), resultantes da basofilia.
- Concentrações séricas elevadas de desidrogenase láctica.
- Hipercalcemia.
- Hipocalémia.
- hipocolesterolemia.³

6. Diagnóstico diferencial

A LMC tem um fenótipo e genótipo homogéneo e é causada pela mutação *BCR-ABL1*. Pelo contrário, na maioria das outras leucemias, neoplasias hematológicas e não hematológicas, os fenótipos são mais heterogéneos e a diversidade genotípica e a complexidade mutacional são extraordinariamente maiores.⁵⁰ A LMC é uma leucemia única em vários aspetos, pois a mutação *BCR-ABL1* é a condição para causar a doença, e todos

os doentes com LMC apresentam uma mutação semelhante e produto génico com apenas pequenas variações.⁵⁰

A LMC deve ser diferenciada da reação leucemoide (tabela 5), definida como condição benigna que, como o processo leucémico, também cursa com leucocitose e desvio à esquerda.

Nesta, a contagem neutrofílica pode variar entre $30-100 \times 10^9/L$ ³, com presença de granulações tóxicas, corpos de Döhle nos granulócitos, ausência de basofilia e do cromossoma Ph, e níveis de fosfatase alcalina dos neutrófilos (NAP) aumentados.⁴² O achado de neutrofilia com desvio à esquerda é escalonado e em casos graves é possível a presença de promielócitos e mieloblastos circulantes.

Torna-se necessário confirmar a presença de Ph ou transcritos *BCR-ABL1*⁵¹ e recorrer ao diagnóstico diferencial, uma vez que, um diagnóstico preciso da LMC é útil para estimar o prognóstico do paciente, identificar a utilidade dos TKIs e avaliar o momento de terapias especiais, como o transplante alogénico de células-tronco hematopoiéticas.³

Para além das reações leucemoides, é indispensável o diagnóstico diferencial da LMC de outras leucemias crónicas e de síndromes mieloproliferativas.

Certas características como: leucocitose por neutrófilos segmentados (semelhantes LNC), trombocitose marcada com leucocitose ligeira (semelhante trombocitemia essencial (TE)), leucocitose com monocitose (semelhante a leucemia mielomonocítica crónica(LMMC)) e a existência de FA ou FB sem histórico de FC, dificultam o diagnóstico da LMC.³³

Tabela 5- Critérios para o diagnóstico diferencial de leucemia mieloide crónica e reação leucemoide.

	LMC	REAÇÃO LEUCEMOIDE
CROMOSSOMA PH	Presente	Ausente
ANEMIA	Muito frequente	Não frequente
NEUTRÓFILOS	Desvio à esquerda sem escalonamento	Desvio à esquerda com escalonamento
EOSINÓFILOS	Aumentados	Valores normais
BASÓFILOS	Aumentados	Valores normais
PLAQUETAS	Trombocitopenia ou trombocitose	Valores normais
VALOR DE NAP	Diminuído	Aumentado
GRANULAÇÕES TÓXICAS	Ausentes	Aumentadas
CORPOS DE DÖHLE	Ausentes	Presentes

NAP-fosfatase alcalina dos neutrófilos.

Adaptado de Jabbour E. ⁴²

Outros tipos de leucemias crónicas, apresentam algumas semelhanças com a LMC, as quais devem ser consideradas no diagnóstico diferencial.

- Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

É uma neoplasia que pode ser distinguida da LMC pela presença de características displásicas, citopenias mais proeminentes, monocitose mais proeminente e ausência de basofilia. A LMMC é Ph-negativo e pode ter outras alterações citogenéticas.^{2, 20}

A maior dificuldade diagnóstica ocorre quando os pacientes apresentam esplenomegalia e leucocitose, mas não possuem o cromossoma Ph. Pacientes Ph negativo e *BCR-ABL* negativos poderão ter LMC Ph negativo ou LMMC.⁴²

- “LMC atípica.”

Cerca de 95% dos casos de LMC apresentam o cromossoma Ph, e os demais, Ph e *BCR-ABL1* negativos, são classificados como uma entidade à parte (LMC atípica), uma LMC Ph-²

- Leucemia Neutrófila Crônica (LNC)

Casos raros de LMC com um transcrito p230 *BCR-ABL1* podem ser confundidos com LNC devido à neutrofilia predominante associada a esta apresentação da LMC, mas a citogenética demonstra o cromossoma Ph, que os distinguirá facilmente.^{2 20}

Raramente, os pacientes têm hiperplasia mieloide, que envolve quase exclusivamente a linhagem de células de neutrófilos, eosinófilos ou basófilos. Esses pacientes são descritos como tendo leucemia crônica neutrófila, eosinófila ou basófila e não têm evidência do cromossoma Ph ou do gene *BCR-ABL1*.⁴²

- Síndromes mieloproliferativas (SMP)

Durante vários anos a LMC foi classificada como um síndrome mieloproliferativo. Estas síndromes são definidas, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como alterações das *stem cells* hematopoiéticas, com proliferação anormal de uma ou mais linhas celulares. Estes síndromes incluem a policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose (MF), que apresentam alguns achados clínicos e laboratoriais semelhantes à LMC (Tabela 6), sendo, por isso, importante fazer o diagnóstico diferencial.³

A principal característica, que permite distinguir estas patologias da LMC, é a presença de mutação no gene *JAK2* (*Janus-associated kinase 2*), no gene *CALR* (Calreticulina) ou no gene *MPL* (*myeloproliferative leukemia protein*).³

Nos síndromes mieloproliferativas, tal como na LMC, é comum a esplenomegalia, hepatomegalia, leucocitose e trombocitose, e podem também evoluir para leucemia mieloide aguda.³

Policitemia vera (PV)

Na PV observa-se eritrocitose com aumento da concentração da hemoglobina e de Ht, podendo os doentes apresentar sintomas de pletora, o que não se observa nos doentes com LMC.³ Esses pacientes geralmente têm um *score* NAP normal ou aumentado.⁴² no entanto, como se referiu a PV é Ph-, apresentando a mutação no gene *JAK2*.

Trombocitemia essencial (TE)

Raros casos de LMC podem apresentar trombocitose isolada, sem leucocitose como se observa na TE; no entanto, a basofilia está frequentemente presente, o que é importante como uma pista diagnóstica. Esses casos de LMC serão diferenciados por estudos citogenéticos e moleculares, mostrando positividade para o cromossoma Ph e positividade para *BCR-ABL1*.^{2,20}

Os doentes com TE têm valores de plaquetas superior a 450×10^9 /L e podem apresentar ligeira neutrofilia, o que a diferencia da LMC, em que os doentes apresentam intensa neutrofilia, mesmo com contagens de plaquetas semelhantes.³

Mielofibrose (MF)

A MF é um distúrbio no qual o tecido fibroso da MO é produzido em excesso, que resulta na produção reduzida de glóbulos vermelhos com forma anormal, anemia e baço aumentado.

A MF deve-se a mutações nos genes *JAK2 V617F*, *CARL* ou *MPL*.⁵²

Tabela 6- Características da leucemia mieloide crónica, policitemia vera, mielofibrose e trombocitemia essencial, de importância para o diagnóstico diferencial.

	ACHADOS HEMATOLOGICOS	CROMOSSOMA PH	HEPATOESPLENOMEGALIA	MUTAÇÃO EM JAK 2, CALR OU MPL
LMC	▪ Leucocitose de $12-1000 \times 10^9 /L$ ▪ Linha granulocítica alterada, com precursores mieloides não escalonados ▪ Trombocitose ou trombocitopenia	Presente	Presente	Ausente
PV	▪ ♂ Hb > 18,5 g/dL ▪ ♀ Hb > 16,5 g/dL	Ausente	Presente	Presente
MF	▪ Anemia ▪ Leucoeritroblastose	Ausente	Presente	Presente
TE	▪ Trombocitose	Ausente	Presente	Presente

Hb, hemoglobina; LMC, leucemia mieloide crónica; MF, mielofibrose; Ph, cromossoma Filadélfia; PV, policitemia vera; SP, sangue periférico; TE, trombocitemia essencial; *JAK 2*; *Janus-associated kinase 2*; CALR, Calreticulina; MPL, *myeloproliferative leukemia protein* ; ♀, mulheres; ♂, homens.

Adaptado de Liesveld JL³ e OMS.

7. Prognóstico

Os *scores* prognósticos auxiliam os clínicos na seleção de tratamentos ajustados ao risco e na avaliação comparativa de diferentes resultados. Para o seu cálculo são usados fatores que influenciam o curso e a evolução da doença, possibilitando uma melhor estratégia terapêutica.⁵³

Os *scores* prognósticos baseiam-se em fatores clínicos obtidos antes do início de qualquer terapia⁵, como todos os *scores* de estratificação de risco; é importante documentar as contagens globulares sanguíneas e o tamanho do baço.¹ É também de salientar, que a presença de alterações cromossômicas além do Ph, observadas no momento do diagnóstico, ou durante o curso da terapia, agrava o prognóstico.⁵

O estadió da doença é o fator prognóstico mais importante²⁰. Para os pacientes com LMC na FC, há quatro *scores* prognósticos basais que podem ser utilizados, para auxiliar na aplicação do prognóstico, e que são o *score* de Sokal, Hasford, *EUTOS* e *EUTOS-ELTS*.

54

7.1- *Score* de Sokal

O *score* de Sokal, foi publicado em 1984, baseando-se em dados de sobrevida de 813 pacientes com LMC que foram tratados com terapia convencional, como quimioterapia de agente único (principalmente bussulfano) ou quimioterapia combinada (com interferão)²⁸. O *score* baseia-se na idade do doente, contagem de blastos e de plaquetas no sangue, e dimensão do baço; *scores* de <0,8, 0,8-1,2, >1,2 definem categorias de baixo, intermédio e alto risco¹, prevendo probabilidades de sobrevida global significativamente diferentes.⁵⁵ (tabela 7)

O *score* de risco clínico de Sokal é a única variável associada a uma probabilidade significativa de falha na RLT, sendo que pacientes com baixo risco de Sokal são menos propensos a apresentar recorrência molecular.⁵⁶

7.2- Score de Hasford

Em 1998, Hasford e colaboradores demonstraram que o score de Sokal não era capaz de discriminar o prognóstico de pacientes tratados com interferão alfa (IFN α). Assim, foi introduzido este score, para melhor avaliar o risco para estes pacientes.⁵ O cálculo prognóstico considera os mesmos fatores prognósticos (idade, dimensão do baço, contagem de blastos, contagem de plaquetas), observados para o score de Sokal, e ainda, o valor de eosinófilos e de basófilos. Segundo este score, os pacientes podem apresentar baixo, intermédio e alto risco, tal como no score de Sokal.²⁸(tabela 7)

O score de Sokal e o score de Hasford foram desenvolvidos na era pré-imatinibe, mas mantêm a significância prognóstica em pacientes tratados com imatinibe.²⁰

7.3- Score EUTOS

O score *European Treatment and Outcome Study for CML (EUTOS)* foi publicado pela primeira vez em 2011, para propor uma ferramenta prognóstica que pudesse identificar pacientes com maior tendência para não responder ao tratamento com imatinibe²⁸, ou seja, para melhor prever a sobrevida livre de progressão para a FA ou FB. ⁵Com a utilização de dados de pacientes que foram tratados com imatinibe, em 2011, o score *EUTOS* (tabela 7) identificou dois grupos de risco com probabilidades significativamente diferentes de resposta citogenética completa após 18 meses de terapia. ⁵⁵

Vários estudos validam este score, mostrando a sua superioridade, em relação aos scores de Sokal e Hasford. A maioria dos estudos de validação mostrou que pacientes de alto risco podem ser facilmente distinguidos de pacientes de baixo risco pelos três scores, enquanto o grupo de risco intermédio não foi facilmente identificado pelos scores de Sokal e Hasford. Além disso, os pacientes de alto risco identificados pelo score *EUTOS* parecem ter os resultados mais desfavoráveis. Curiosamente, alguns estudos mostraram que o score *EUTOS* foi preditivo de diferentes riscos em pacientes tratados com imatinibe, mas não em pacientes tratados com TKIs de segunda geração. ²⁸

A principal limitação do score continua a ser a obtenção de resposta citogenética completa (RCC) em 18 meses, uma vez que segundo as diretrizes da *European Leukemia Net (ELN)*, é recomendada a obtenção da resposta em 6 meses (resposta ideal). Além disso, não

existem métodos padronizados para medir o tamanho do baço e isso pode impactar significativamente a confiabilidade. Deve ser considerada uma medida molecular de eficácia mais sensível (por exemplo, resposta molecular em 3 e 6 meses) do que de RCC.

28

7.4- Score *EUTOS-ELTS*

Em 2016, o score *EUTOS Long-Term Survival (ELTS)* foi introduzido para distinguir três grupos de risco, com probabilidades significativamente diferentes de mortalidade⁵⁵. Em países desenvolvidos, a percentagem de doentes com LMC de alto risco no momento do diagnóstico é inferior a 10%, enquanto que nos países em desenvolvimento é de cerca de 20-25%.⁵

Este score, ELTS, considera o facto de que a maioria dos pacientes com LMC com acesso a tratamento com TKIs não morre de LMC. Este score foi superior a todos os outros na previsão da morte relacionada com LMC, em pacientes na fase crónica tratados com imatinibe; por isso, o seu uso é recomendado em pacientes tratados com TKIs.¹

Este score foi testado em cerca de 2.290 pacientes tratados com imatinibe, diagnosticados entre 2002 e 2006, e baseando-se nos mesmos dados (hematológicos simples, dimensão do baço e idade) que o score de Sokal e estratificou os pacientes em três classes de risco: baixo, intermédio e alto risco (tabela 7). É capaz de fornecer uma estratificação mais definida do risco de morte relacionada à LMC no diagnóstico, independentemente do tipo de TKI usado, em comparação com os outros scores.²⁸

O score *ELTS* foi capaz de prever a obtenção de resposta molecular major (RMM) e sobrevida relacionada com LMC. Portanto, o uso deste score, especialmente em pacientes idosos, pode melhorar a estratificação de risco e direccionar a melhor escolha de tratamento, minimizando o risco de “excesso” de tratamento, com previsão de eventos relacionados com a LMC e respostas ao tratamento.²⁸

Na era dos inibidores de segunda e terceira geração, a expectativa de vida dos pacientes com LMC está gradualmente a atingir a expectativa de vida normal da população, e em geral, a morte já não se deve a causas relacionadas com a LMC.²⁸

Embora o score de Sokal ainda seja um dos scores mais usados em estudos clínicos, o ELTS foi recomendado como o método preferencial para avaliar o risco nos doentes com LMC.²⁸

Tabela 7- Comparação entre os scores Sokal, Hasford, *EUTOS* e *EUTOS- ELTS*

SCORE	FÓRMULA	DEFINIÇÃO DE RISCO
SOKAL	$\text{Exp } 0.0116 \times (\text{idade} - 43.4) + 0.0345 \times (\text{baço} - 7.51) + 0.188 \times [(\text{n}^\circ \text{ plaquetas} / 700)^2 - 0.563] + 0.0887 \times (\text{blastos} - 2.10)$	Baixo < 0.8 Intermédio 0.8-1.2 Alto >1.2
HASFORD	$0.666, \text{ se idade} \geq 50, + (0.042 \times \text{baço}) + 1.0956, \text{ se plaquetas} > 1500 \times 10^9 / \text{L}, + (0.0584 \times \text{blastos}) + 0.20399, \text{ se basófilos} > 3\%, + (0.0413 \times \text{eosinófilos}) \times 100$	Baixo ≤ 780 Intermédio 781 - 1480 Alto > 1480
EUTOS	$\text{Baço} \times 4 + \text{basófilos} \times 7$	Baixo ≤ 87 Alto > 87
ELTS	$0.0025 \times (\text{idade}/10)^3 + 0.0615 \times \text{baço} + 0.1052 \times \text{blastos} + 0.4104 \times (\text{plaquetas}/1000)^{-0.5}$	Baixo <1.5680 Intermédio 1.5680–2.2185 Alto > 2.2185

Parâmetros de comparação: Idade em anos. Baço, distância máxima em centímetros abaixo da grade costal. Blastos, eosinófilos e basófilos em valores percentuais da contagem total de leucócitos.

Adaptado de Breeccia M et al., ²⁸

É possível o cálculo de risco de Sokal e Hasford, *EUTOS* e *EUTOS-ELTS*, recorrendo à plataforma *ELN*, preenchendo os dados solicitados através do site: https://www.leukemia-net.org/leukemias/cml/euro_and_sokal_score/.

Em alguns doentes, a translocação entre o cromossoma 9 e 22 pode não ser identificada. Estes doentes podem responder à terapêutica, com uma taxa de sobrevivência semelhante

à dos doentes Ph+. Nos doentes que apresentam Ph- e LMC com o gene *BCR-ABL* negativo, o prognóstico é pior.¹⁷

Em doentes submetidos a transplante, o *score European Bone Marrow Transplantation Consortium Risk* é avaliado tendo em conta parâmetros como, a idade, o volume do baço, as contagens periféricas de blastos, de basófilos, de eosinófilos e de plaquetas.⁵⁷

Outros preditores de pré-tratamento propostos incluem o nível de expressão do transportador de catiões orgânicos-1 (*OCT-1*), o qual é necessário para a entrada de imatinib na célula. Esta proteína (e RNA correspondente), pode ser quantificada e níveis mais altos de expressão e/ou atividade estão associados a uma sobrevida superior em pacientes tratados com imatinibe. A atividade de *OCT-1* não é importante para pacientes tratados com nilotinibe ou dasatinibe, pois esses medicamentos não são substratos de *OCT-1*.²

Em cerca de 3 a 5% dos casos de LMC, o recetor *FLT3* encontra-se mutado.⁵⁸ O gene *FLT3* é o segundo gene que se encontra sobreexpresso na LMC na FB, e cuja expressão desregulada pode contribuir para a progressão da LMC. Assim, a avaliação da expressão deste gene neste tipo de patologias é um fator prognóstico, podendo ajudar a identificar a FB da LMC. Esta ativação é provocada por vários mecanismos, incluindo translocações cromossómicas e várias mutações, resultando num pior prognóstico para o doente.⁵⁹

O aumento da expressão de proteína Hop (que se pode ligar simultaneamente a HSP70 e HSP90, regulando as suas funções), está também associada ao aumento da expressão de *BCR-ABL*. A HSP90 é uma molécula modulada positivamente por *BCR-ABL*, identificada como potencial alvo terapêutico na LMC, pois liga-se e protege *BCR-ABL* da degradação pelo proteossoma. A proteína HSP70 é uma molécula com funções anti-apoptóticas, presente em *BCR-ABL* e são resistentes ao mesilato de imatinibe, pelo que foi sugerido o seu envolvimento no desenvolvimento de resistência a este inibidor de tirosina quinase.⁶⁰

O gene Polycomb *BMI1* é expresso em doentes Ph negativo e em fases avançadas da LMC, e tem sido associado a um mau prognóstico. O *BMI1* pode ser um novo e válido marcador de resposta à terapia com TKI na LMC, independentemente do nível de transcrição *BCR-ABL1*.³⁸

8. Tratamento-Abordagem terapêutica

Ao longo dos anos surgiram vários tipos de tratamentos para a LMC. Os primeiros tratamentos, no início de 1900, consistiam na utilização de arsénio, radioterapia do baço, bussulfano ou um inibidor da ribonucleotídeo redutase.⁴ Estes agentes não tinham a capacidade de eliminar os clones malignos, surgindo em meados da década de 1970, o transplante alogénico de células-tronco, que permitiu a eliminação do clone Ph positivo em pacientes com LMC.²⁵

O reconhecimento de que a proteína quimérica *BCR-ABL* é fundamental para a patogénese e progressão da doença, levou, no final da década de 1990, à síntese de um TKI que inibiu *ABL* e outras tirosina quinases, revolucionando a terapia da LMC.²⁵ A introdução de TKIs mudou o curso natural da LMC e melhorou a sobrevida do paciente,²³ uma vez que foi possível o desenvolvimento de substâncias direcionadas especificamente para a doença.²² A proteína *BCR-ABL* pela sua elevada atividade de tirosina quinase que possui, constitui o grande alvo no tratamento da LMC.³²

Existem cinco TKIs atualmente aprovados para o tratamento da LMC na FC: imatinibe, o TKI de primeira geração; nilotinibe, dasatinibe e bosutinibe, TKIs de segunda geração; e ponatinibe, um TKI de terceira geração. A maioria dos pacientes em FC recebe imatinibe como tratamento de primeira linha, obtendo-se um bom controlo da doença a longo prazo.⁶¹

O imatinibe foi o primeiro inibidor de tirosina-quinase disponível, inicialmente aprovado para pacientes que não respondiam ao IFN- α ,⁵ fazendo inibição específica da enzima tirosina quinase²⁵, mas também tem ação sobre outras tirosinas quinases, incluindo a *c-KIT*, *ABL1*, *ABL2*, *M-CFS* e *PDGFRB*. A Dose preconizada é de 400mg/dia, por via oral, embora possa variar consoante a progressão da doença² e a sua ação é avaliada pela resposta hematológica (desaparecimento de sintomas e esplenomegalia e normalização dos parâmetros do hemograma), resposta citogenética e resposta molecular.²²

Após o surgimento de resistência e intolerância ao imatinibe em alguns pacientes, foram desenvolvidos TKIs de segunda geração, sendo três aprovados para uso clínico em várias partes do mundo: dasatinibe, nilotinibe e bosutinibe.⁵

Ponatinibe é um TKI de terceira geração com atividade com mais potencial contra todas as mutações do domínio da quinase *ABL1* testada,⁵ e é o único TKI com atividade em pacientes com a mutação T315I.² É considerado atualmente como o TKI aprovado com mais potencial, pela baixa seletividade, uma vez que inibe quinases adicionais; no entanto,

apresenta também riscos, principalmente cardiovasculares. Uma vez que a sua toxicidade é dependente da dose administrada, após alcançar a resposta desejada torna-se necessário avaliar o seu potencial com doses mais baixas.³²

A decisão sobre qual TKI usar deve ser feita de forma individualizada a cada utente e depende da avaliação de fatores como: o risco relativo da doença, fatores de risco para eventos adversos específicos (por exemplo, eventos arteriotrombóticos, derrame pleural, hipertensão pulmonar, diabetes mal controlada, pancreatite, etc.)²

Apesar dos claros benefícios do tratamento da LMC com TKIs, a ocorrência de eventos adversos crônicos relacionados com o tratamento pode prejudicar a qualidade de vida dos pacientes. Os principais efeitos adversos relacionados com o tratamento de longo prazo com TKI são: edema, diarreia, náusea, fadiga, cefaleia, dor musculoesquelética, toxicidade muscular e dispneia,⁶² tendo um impacto substancial na qualidade de vida quando persistem por longos períodos de tempo.⁶³

Podem ocorrer resistências a TKIs. Para pacientes resistentes a um TKI de segunda geração, deve-se realizar uma análise mutacional, avaliar comorbilidades e iniciar a procura de um dador adequado para transplante, pois para pacientes que falharam um TKI, uma mudança de tratamento é obrigatória para limitar o risco de progressão e morte.⁶¹

O alotransplante corresponde a uma terapêutica potencialmente curativa para pacientes com LMC e durante muitos anos forneceu a melhor opção para remissão a longo prazo e uma possível cura.² Atualmente é indicado quando os pacientes progridem para FA. Com os avanços recentes, as crianças submetidas a transplante têm menos complicações. É também opção para pacientes que não podem ou não querem continuar com TKI ao longo da vida.⁶⁴

Desde a introdução de TKIs, o transplante de *stem cells* raramente é usado como terapia inicial,⁵ sendo utilizado apenas com a identificação de dadores completamente compatíveis com *HLA*¹⁹ e indicado para pacientes jovens e nos casos em que ocorre resposta insatisfatória ou resistência aos TKIs.⁶⁵

Os objetivos do tratamento com TKIs são obter resposta hematológica completa após 3 meses de tratamento, resposta citogenética completa após 12 meses e resposta molecular após 18 meses.²⁴

9. Monitorização

A monitorização regular de doentes com LMC, é necessária para avaliar a resposta ao tratamento e determinar a necessidade de intervenções em momentos cruciais. É particularmente importante na avaliação da adesão e de eventos adversos, no caso de mudança de tratamento ou de otimização da dose,⁵ identificando precocemente pacientes que não respondem de forma ideal, de modo a que possam ser consideradas outras terapias,²³ ou até identificar pacientes em resposta molecular completa sustentada, que sejam elegíveis para descontinuação de TKI.³⁸

A translocação recíproca t(9;22) é a base da patologia, diagnóstico e monitorização na LMC⁶⁶; daí a importância de identificar o nível de *BCR-ABL* no diagnóstico e após início do tratamento.³⁰ A monitorização terapêutica da LMC através da determinação da relação *BCR-ABL1/ABL1* para avaliar a resposta molecular é uma ferramenta essencial para que o clínico possa detetar o mais rapidamente possível uma evolução desfavorável (recidiva molecular), antes que a doença reapareça clinicamente.⁴³

A monitorização da doença inclui a avaliação de hemogramas completos, cariótipos de MO (realizados até à remissão citogenética completa ou em caso de recidiva citogenética) ou sangue periférico e *RT-PCR* quantitativo (*RT-qPCR*).⁴³

Os métodos de monitorização de doenças devem garantir uma deteção rápida, barata e sensível da doença. No caso de perda de RMM durante o acompanhamento, a ocorrência de mutações *ABL1* deve ser investigada e a monitorização molecular deve ser realizada com mais frequência.³⁸

O primeiro objetivo do tratamento é a normalização do hemograma, ou seja — remissão hematológica completa (RHC). Segundo as indicações da *ELN*, é aconselhável monitorizar de 15 em 15 dias, até atingir a RHC.⁶⁶ Se o tratamento for interrompido neste ponto, o hemograma rapidamente se torna anormal.¹⁹ O estudo do hemograma é indicado periodicamente para avaliar a normalização das concentrações de leucócitos e para identificar a mielossupressão (um efeito colateral comum observado com TKIs). Assim que as contagens sanguíneas periféricas estabilizam, a monitorização do hemograma pode ser alterar-se para cada 4-6 semanas e, eventualmente, para cada 3-6 meses.⁵

O segundo objetivo do tratamento é aprofundar a resposta, alcançando a negatividade do cromossoma Ph, ou seja, a RCC. O exame citogenético convencional requer que as células estejam em mitose, podendo avaliar-se com amostras de sangue e/ou aspirado invasivo de MO. Mesmo assim, é difícil visualizar mais de 20 metáfases. Se nenhum contém o cromossoma Ph, diz-se que a doença está ausente, a um nível de um em 20 (sensibilidade de 5%).¹⁹

9.1-Testes citogenéticos

Na monitoração da resposta citogenética, incluem-se as técnicas para avaliação do cariótipo medular e FISH. Pode combinar-se a citogenética convencional e o estudo molecular para uma monitorização quantitativa.¹⁹

É de extrema importância a avaliação do cariótipo em amostras de SP ou MO de pacientes com LMC, no diagnóstico e no decorrer da doença,⁴⁵ sendo possível quantificar o número de metáfases Ph+ e detetar alterações cromossômicas adicionais, no momento do diagnóstico e a cada seis meses, até à RCC, e, atingida a RCC, a cada um a dois anos.²⁵

O método de FISH é útil na demonstração de translocação 9-22 e deteção do gene *BCR-ABL*, podendo contribuir para a identificação de doença residual mínima (DRM), mas não deteta as demais anomalias cromossômicas.⁴⁶

Atualmente, é recomendado que os pacientes realizem um estudo da MO aos 3, 6 e 12 meses após o início da terapia.⁴² A *ELN* sugere testes citogenéticos aos 3 e 6 meses, e depois a cada 6 meses, até que uma RCC seja alcançada.²²

Segundo a *ELN*, a citogenética convencional já não é mais recomendada para monitorização de rotina, sendo apenas indicada se a monitorização molecular não for possível, como no caso de translocações atípicas e ACAS.⁶⁷

9.2-Testes moleculares

A monitorização molecular desempenha um papel essencial em pacientes com LMC, pois é crucial para a maioria das decisões clínicas.²⁴

Uma vez alcançada a RCC, apenas os métodos moleculares permitem acompanhar a dinâmica da DRM ao longo do tempo.⁴⁶

Para o acompanhamento de pacientes com LMC, a *ELN* preconiza monitorização da resposta molecular a cada 3 meses até que uma RMM (pelo menos) seja alcançada; depois de atingida a RMM, a monitorização molecular será feita a cada 3 a 6 meses.³⁴

9.2.1-RT-*qPCR* e *dPCR*

A análise molecular com a utilização do método *RT-qPCR*, apresenta uma alta correlação com os resultados obtidos pela análise citogenética. Através deste método, é possível identificar o rearranjo *BCR-ABL1* e determinar o número de cópias de mRNA de *BCR-ABL1*.³⁴

Diretrizes da *ELN* e da *NCCN* recomendam que a técnica de *qRT-PCR* seja utilizada para a monitorização da doença em todos os pacientes com LMC.⁴¹

A *RT-qPCR* é o método aceite para monitorizar a resposta a TKIs, ¹⁹ pelo que é clinicamente importante para determinar a resposta ao tratamento e seleccionar a estratégia de tratamento ideal.⁶⁸ Atualmente, após grande esforço internacional, a expressão *BCR-ABL1* avaliada em qualquer laboratório, é padronizada e expressa em “escala internacional”(IS).²⁴

Os resultados de *RT-qPCR* dependem da capacidade dos laboratórios para avaliar o valor absoluto de transcritos de genes de controle (*ABL1*, *GUS*) e para atingir a sensibilidade de *PCR* necessária para *BCR-ABL1*.⁶⁷

A maioria dos laboratórios não realiza *RT-qPCR* para transcritos atípicos de *BCR-ABL1*, pois a padronização para o IS ainda não foi realizada para as diferentes isoformas ou variantes; portanto, a avaliação de RMM não pode ser realizada com precisão nesses pacientes com LMC. Nesses casos, a monitorização pode ser realizada por FISH ou por *Nested RT-PCR* convencional.³⁸

A monitorização convencional e padronizada de *BCR-ABL1* por *RT-qPCR* não consegue distinguir entre o transcrito *BCR-ABL1* clássico e diferentes isoformas ou variantes de splicing anormais. Portanto, é crucial identificar os transcritos convencionais de *BCR-ABL1*

para obter uma avaliação precisa da DRM e distinguir as isoformas variantes possivelmente responsáveis pela resistência à terapia.³⁸

A avaliação por *RT-qPCR*, dos níveis de transcrição de *BCR-ABL1* tornou-se o protocolo padrão na LMC. Seria importante o desenvolvimento de outras metodologias para avaliar a carga leucémica de forma mais eficiente, monitorizar a DRM, detetar mutações que levam à resistência à terapia com TKI e identificar preditores de resposta à terapia com TKI.⁵⁶

Foram já desenvolvidas novas técnicas que poderão ajudar na monitorização da doença, porém necessitam de passar por um processo de validação para serem implementadas na rotina:

No campo da *PCR* quantitativa, a *PCR* digital (*dPCR*) é uma ferramenta nova e promissora, sensível e precisa.²⁴ Várias publicações relataram que a *dPCR* é melhor na deteção da DRM do que a *RT-qPCR* e que tem uma maior precisão, mesmo para baixos níveis de transcrição de *BCR-ABL1*, contribuindo para selecionar pacientes mais compatíveis com RLT.⁶⁹

A alta sensibilidade e precisão (com uma quantificação de alta confiança sem necessidade de uma curva de calibração) e a excelente reprodutibilidade, fazem deste procedimento um método alternativo ideal para a deteção de níveis muito baixos da doença.⁷⁰ Todavia apresenta limitações, pois geralmente requer tempo experimental; pode ser condicionada por erros em fases pré-analíticas como na amostragem, extração de RNA e síntese de cDNA,³⁸ necessita de conhecimentos específicos, para a sua execução; pelo que faz com que seja um método com elevados custos.⁷⁰

A *dPCR* é utilizada na área hematológica avaliando mutações de *Janus Kinase 2* (*JAK2*), *DNA methyltransferase 3 alpha* (*DNMT3A*) ou quantificando alguns genes de fusão, como *PML-RAR γ* ou *BCR-ABL1*²⁴; no entanto, é necessária uma padronização internacional para ser considerado um método molecular de rotina para a monitorização de LMC.^{38 24}

O RQ multiplex, um método de *PCR* capaz de detetar pelo menos 14 possíveis isoformas do gene de fusão *BCR-ABL1* numa reação com alta sensibilidade e especificidade, foi recentemente desenvolvido para o diagnóstico preciso de LMC e a monitorização de DRM. Este método é rápido, simples e barato e é capaz de detetar várias isoformas principais (*M-BCR*), menores (*m-BCR*), micro (μ -*BCR*) e nano (*n-BCR*) de *BCR-ABL1*.³⁸

O sistema GeneXpert é um método automatizado de *RT-qPCR*, com a capacidade de detetar transcritos *BCR-ABL1* p210, ao processar diretamente amostras de SP, e de realizar extração de RNA e detecção de fluorescência de *BCR-ABL1*. Estudos recentes demonstraram uma boa correlação entre o *RT-qPCR* padronizado e os sistemas GeneXpert para a monitorização de *BCR-ABL1*. No entanto, transcritos atípicos não podem ser identificados pelo ensaio GeneXpert atual; assim, todos os casos suspeitos de LMC negativos devem ser monitorizados por outros métodos moleculares.³⁸

9.2.2-Ngs

A *Ngs* melhorou a capacidade de identificar alterações genéticas associadas a doenças hematológicas, abrindo novas possibilidades diagnósticas e terapêuticas. A *Ngs* faz parte dos métodos de rastreio e monitorização de muitas doenças hematológicas, sendo um instrumento válido também para a estratificação de risco e para a escolha da terapia.²⁸

Comparando com o método de sequenciamento de Sanger, a *Ngs*, tem maior sensibilidade, é capaz de detetar mutações em nível subclonal, bem como mutações compostas, que são responsáveis pela resistência a TKIs; a *Ngs* demonstra ter um perfil clinicamente relevante para a escolha de TKI, assumindo um papel clínico relevante na LMC.²⁴

A análise da mutação *BCR-ABL1* deve ser realizada após a falha de um TKI de segunda geração, usando o sequenciamento Sanger convencional e possivelmente esta técnica. Os resultados da mutação podem orientar a seleção do TKI mais apropriado e evitar o uso de um TKI inadequado.⁶¹

A *Ngs* pode ser útil para a identificação de mutações de mtDNA em casos de LMC; podendo ser útil para monitorizar a resposta à terapia com TKI e para uma melhor seleção de pacientes elegíveis para RLT.⁶⁸

A *Ngs* ainda não está totalmente padronizada, ao contrário da de *RT-qPCR*; em caso de transplante alogénico, o sequenciamento de Sanger ainda é a técnica recomendada.²⁴

9.2.3-Biossensor DNA

Um novo sistema para a detecção do transcrito quimérico *BCR-ABL1* foi recentemente desenvolvido, usando um biossensor de DNA eletroquímico baseado em nanopartículas de ouro-polianilina. É uma ferramenta rápida, simples e inovadora para a detecção molecular do transcrito *BCR-ABL1*, apresentando alta especificidade e sensibilidade. Pode, portanto, ser considerado um método útil na monitorização de DRM na LMC.³⁸

9.2.4-Imunoesferas de citometria de fluxo

A proteína quimérica *BCR-ABL1* é considerada como um alvo na monitorização da DRM na LMC. Foi desenvolvido um ensaio de citometria de fluxo usando imunoesferas para a detecção de proteínas de fusão *BCR-ABL1* (p190, p210 e p230) em lisados celulares. Neste tipo de ensaios as imunoesferas são revestidas com anticorpos específicos e a amostra em estudo é marcada para produzir quimioluminescência que será posteriormente quantificada. A presença de anticorpos de detecção anti-ABL1 mostra total concordância com a técnica de *RT-PCR*.³⁸

9.2.5-CBA

O sistema *CBA* (*cytometric bead array*), demonstrou ser um teste rápido e fácil na detecção específica de proteínas *BCR-ABL1* em células leucémicas. A técnica é independente do ponto de quebra do gene *BCR*, necessita de um citómetro de fluxo e produz resultados em cerca de quatro horas. O teste *PLAflow* está fortemente correlacionado com a técnica *RQ-PCR*, tanto no diagnóstico da doença quanto na monitorização da DRM. Uma vez que permite a imunocoloração simultânea de marcadores celulares adicionais, permite identificar populações celulares específicas envolvidas na progressão da doença da LMC.³⁸

9.2.6-Sequenciamento de células únicas

As tecnologias de sequenciamento de células únicas, permitiram uma melhor identificação e caracterização de SCL na LMC, distinguindo-as das células-tronco saudáveis, por combinação da análise de expressão gênica com a triagem de marcadores de superfície celular. Esta técnica pode ser útil para identificar e estudar os casos raros de LMC.³⁸

A otimização da monitorização *BCR-ABL1* pode ser prevista, aumentando a disponibilidade de testes rápidos e padronizados e cada vez mais ensaios moleculares sensíveis que permitem a quantificação de DRM e detecção de mutações de resistência.⁴¹

10. Resposta terapêutica

Existem 3 tipos de resposta à terapêutica na LMC (tabela 8), e que traduzem a eficácia do tratamento:

- Resposta hematológica
- Resposta citogenética
- Resposta molecular

A resposta ideal à terapêutica está associada ao melhor resultado a longo prazo, ou seja, a um tempo de vida comparável ao da população geral, sem indicação de mudança no tratamento. A avaliação da resposta é crucial para a identificação de pacientes com alto risco de progressão da doença, em que o tratamento deve ser alterado para limitar esse risco de progressão e, conseqüentemente, a morte.²⁵

10.1-Resposta hematológica

É definida pela análise do SP e critérios clínicos², incluindo a normalização das contagens de células sanguíneas e ausência de células imaturas como mielócitos, promielócitos ou blastos, sem esplenomegalia palpável e sem sinais ou sintomas da doença.⁵ Uma resposta

hematológica deve ser mantida por pelo menos 4 semanas para ser considerada sustentada.⁷¹

10.2-Resposta citogenética

É classificada de acordo com a percentagem de metáfases Ph+ pelo cariótipo de rotina na aspiração de MO,² utilizando técnicas de avaliação citogenética convencional, de pelo menos 20 células de medula em metáfase.²²

Segundo as recomendações da *ELN*, a resposta citogenética completa é definida com 0% de Ph+; a resposta citogenética “major” com 1–35%, minor com 36–65%, mínima com 66–95% e ausência de resposta com > 95%.²⁵

O ideal será alcançar 0% de metáfases para Ph+, uma vez que melhora a sobrevida global e se traduz numa expectativa de vida quase normal.⁵ Quando se atinge a RCC, o número residual de células Ph+ só pode ser visualizado através de métodos moleculares quantitativos.⁷⁰

10.3-Resposta molecular

A resposta molecular pode ser definida por uma redução de 3 log dos transcritos *BCR-ABL1*, correspondente a resposta molecular “major” (RMM ou MR3.0) com $\leq 0,1\%$ *BCR-ABL*. Com nível de transcritos *BCR-ABL1* acima dos 4 log da linha de base são consideradas respostas moleculares profundas – MR⁴, MR^{4.5}, MR⁵, respetivamente.⁷²

Determina-se através de *PCR* quantitativo de SP. O nível de resposta é quantificado de acordo com o IS e numa escala logarítmica do quociente de transcritos *BCR-ABL1* por transcritos *ABL*. O termo resposta molecular completa, foi descontinuada com o desenvolvimento de métodos de *PCR* mais sensíveis. O avanço da tecnologia mostrou manter-se um grau residual de doença.⁷²

A *ELN* e a *NCCN* recomendam a avaliação das respostas citogenética e molecular aos 3, 6 e 12 meses (avaliando a resposta molecular a cada 3 meses), até que seja atingida uma RMM.⁷²

O primeiro marco importante é a obtenção de uma transcrição *BCR-ABL1* IS nível < 10%, uma redução de pelo menos 1 log dos níveis de transcrição de *BCR-ABL1* da linha de base IS após 3 meses de terapia, definindo a Resposta Molecular Precoce (RMP), considerada uma resposta crucial ao tratamento.³⁸ O segundo marco importante é a obtenção de RCC ao fim de 12 meses, o que significa ausência de Ph e *BCR-ABL1* inferior a 1%.⁷³

Tabela 8-Resposta ao tratamento da LMC

RHC	Leucócitos < 10x10 ⁹ /L		
	Ausência de granulócitos imaturos		
	Basófilos <5%		
	Plaquetas <450x10 ⁹ /L		
	Baço não palpável		
RC	Ausente >95% Ph+		
	Mínima 66 a 95% Ph+		
	Minor 36 a 65% Ph+		
	Major 1 a 35%	≥ log 1	<i>BCR-ABL1</i> (IS%) 10
	Completa <1%	≥ log 2	<i>BCR-ABL1</i> (IS%) 1
RM	MR ³ redução ≥ log 3 ou RMM		<i>BCR-ABL1</i> (IS%) 0,1
	MR ⁴ redução ≥ log 4		<i>BCR-ABL1</i> (IS%) 0,01
	MR ^{4.5} redução ≥ log 4.5		<i>BCR-ABL1</i> (IS%) 0,0032
	MR ⁵ redução ≥ log 5		<i>BCR-ABL1</i> (IS%) 0,001

RHC, Resposta hematológica completa; RC, resposta citogenética; RM, resposta moleucular; *BCR-ABL1*, *Breakpoint Cluster Region- Abelson Murine Leujemia viral oncogene homolog 1*, IS, escala internacional.

Adaptado de Hochhaus A e Mahon ^{66, 72}

Com base na obtenção dos marcos citogenéticos e/ou moleculares, as diretrizes da *ELN* dividem os pacientes com LMC em três grupos: resposta ótima, em alerta e falha.³⁸

A resposta “ótima” está associada ao melhor resultado a longo prazo e indica que nenhuma mudança na terapia é necessária; os doentes com “falha”, no entanto não atingem RMP, RMM ou DRM⁶⁸, o que sugere uma mudança na terapia (alteração de TKI ou procedimento para transplante de células-tronco). Entre “ótimo” ou “falha” há uma resposta intermediária de “aviso” (alerta), que significa que o doente precisa de monitorização mais frequente, para permitir mudanças oportunas na terapia.⁶⁴

Existem recomendações que definem os marcos do tratamento, dados por *ELN* e *NCCN*. (tabela 9).⁴⁴ A principal diferença entre as recomendações da *ELN* e as diretrizes da *NCCN* está nas implicações clínicas dos resultados de monitorização aos 3 meses.

Aos 3 meses, a *ELN* considera um nível de transcrição *BCR-ABL1* superior a 10% um aviso, independentemente do TKI. Já a *NCCN* exige um aumento da dose ou uma mudança para um TKI alternativo se o tratamento primário for com imatinibe; a continuação do tratamento com a mesma dose ou a mudança para um TKI alternativo é possível se o tratamento primário for com dasatinibe ou nilotinibe.⁴⁶

Aos 6 meses, tanto a *ELN* quanto a *NCCN* concordam em exigir uma mudança de terapia em todos os pacientes com um nível de *BCR-ABL1* persistentemente acima de 10%.⁴⁶

Aos 12 meses, os níveis de *BCR-ABL1* inferiores a 0,1% (RMM ou melhor) são uma resposta ideal, e os níveis de *BCR-ABL1* superiores a 1% são uma falha de acordo com a *ELN* e a *NCCN*.⁴⁶

Tabela 9-Recomendações que definem os marcos do tratamento segundo a *ELN* e *NCCN*.

	Ótima		“Aviso”		Falha	
	<i>ELN</i>	<i>NCCN</i>	<i>ELN</i>	<i>NCCN</i>	<i>ELN</i>	<i>NCCN</i>
Diagnóstico	NA	NA	ACAS/Ph+		NA	NA
3 meses	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 10% e/ou Ph+ ≤ 35%	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 10% ou Ph+ ≤ 35%	<i>BCR/ABL1</i> >10% e/ou Ph+ 36-95%		Ausência de RHC, e Ph >95%	<i>BCR-ABL1</i> >10% e/ou Ph+>35%
6 meses	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 1% e/ou Ph+ 0%	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 1% ou Ph+ 0%	<i>BCR/ABL1</i> 1- 10% e/ou Ph+ 1-35%		<i>BCR/ABL1</i> >10% e/ou Ph+ >35%	<i>BCR-ABL1</i> >10% e/ou Ph+>35%
12 meses	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 0.1%	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 1% ou Ph+ 0%	<i>BCR/ABL1</i> 0.1-1%		<i>BCR/ABL1</i> >1% e/ou Ph+ >0%	<i>BCR/ABL1</i> >1% e/ou Ph+ >0%
Após 12 meses	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 0.1%	<i>BCR/ABL1</i> ≤ 0,1% ou Ph+ 0%	ACAS/Ph- (-7 ou 7q-)		Perda de RHC ou RCC, ou perda de MMR e <i>BCR/ABL1</i> >1% ou mutações <i>BCR/ABL1</i> Ou ACAS/Ph+	<i>BCR/ABL1</i> >0,1% e/ou Ph+ >0%

NA, não aplicável,

RHC, resposta hematológica completa; RCC, resposta citogenética completa; MMR, resposta molecular maior; ACAS/Ph-, anomalias citogenéticas em células Ph-

Adaptado de Soverini S ⁶²

11. Tempo de sobrevivência, sucesso e remissão livre de tratamento

A expectativa de vida de pacientes com LMC tratados com TKIs é próxima da expectativa da vida da população em geral.⁴ O tratamento com TKIs ao longo da vida foi recomendado até muito recentemente; os efeitos adversos e toxicidade, os altos custos associados a tratamentos ao longo da vida, têm motivado novas pesquisas que explorem a possibilidade de descontinuar o tratamento com TKI em pacientes que alcançam DMR.¹ A maioria das mortes em pessoas com LMC tratadas com sucesso são de outras causas, como doenças cardiovasculares e novos câncros.³¹

Na LMC, a RLT refere-se a uma DMR estável sem a necessidade de tratamento contínuo com TKI.⁹ Assim, é fundamental identificar pacientes que podem permanecer em RLT e entender quais os fatores biológicos que podem ou não manter essa resposta,⁶³ condição em que se pode descontinuar a terapia com TKIs sem recorrência de leucemia, por intervalos médios de observação de até 7-8 anos.³¹

A vigilância imunológica de células leucêmicas residuais é um dos fatores que podem ser críticos no sucesso da RLT. A caracterização imunológica na LMC pode ajudar a desenvolver novas imunoterapias que visam especificamente as células leucêmicas residuais após a descontinuação do TKI para melhorar as taxas de RLT.⁶⁵

É importante notar que cerca de um quarto dos pacientes que descontinuam os TKIs desenvolvem uma síndrome de abstinência. Esta síndrome consiste em dor musculoesquelética e às vezes rubor. Curiosamente, os pacientes que apresentam síndrome de abstinência de TKI parecem ter maior probabilidade de RLT bem-sucedida.¹

Podem também ocorrer resistências, como já foi referido anteriormente. A resistência primária aos TKIs implica a falha em atingir um nível desejado de resposta, enquanto a resistência secundária ou adquirida implica a perda de resposta durante a terapia. A nível molecular, a resistência ao TKI pode ser o resultado de mecanismos dependentes de *BCR-ABL1* (reativação da atividade da quinase *BCR-ABL1*) ou mecanismos independentes de *BCR-ABL1* (resistência apesar da supressão contínua da atividade da quinase *BCR-ABL1*). A resistência ao TKI representa uma mudança séria na história de um paciente com LMC, pois está associada a piores resultados de sobrevida.¹

Em caso de retoma de tratamento, a terapia resulta na recuperação de uma resposta molecular importante em mais de 90% dos pacientes, a maioria dos quais atinge uma resposta MR4·0. A retoma do tratamento é feita geralmente com o mesmo TKI usado antes da descontinuação, embora um novo TKI possa ser considerado se os eventos adversos contribuíram para a decisão de tentar a remissão.⁵

Os fatores que são preditivos de remissão livre de tratamento bem-sucedido incluem a duração da terapia com TKI, a duração da RMP, o score de risco Sokal e o uso prévio de interferão alfa, sendo a duração da resposta molecular profunda talvez o fator mais preditivo.⁵

12. Conclusão

A LMC consiste numa neoplasia de sintomatologia muito diversa e com casos assintomáticos frequentes, de modo que a avaliação laboratorial do paciente se torna essencial.

As técnicas utilizadas são cada vez mais avançadas, possibilitando análises citogenéticas e moleculares precisas, que permitem não somente a confirmação do diagnóstico como também a monitorização da evolução da doença e da terapêutica. No entanto, o hemograma ainda apresenta grande relevância por ser uma metodologia de fácil acesso e pode auxiliar na identificação de novos casos e no acompanhamento da LMC.

É de extrema importância compreender a patogénese molecular e o potencial de terapias direcionadas, tendo em conta que *BCR-ABL* é o alvo fulcral das estratégias terapêuticas, mas as mutações influenciam muito a resposta ao tratamento com TKIs.

Progressos na compreensão de mecanismos citogenéticos e moleculares subjacentes à falha terapêutica e à progressão da doença melhoram a estratificação de risco da LMC e serão úteis na conceção de novas estratégias terapêuticas.

A introdução dos TKI no tratamento da LMC revolucionou totalmente a gestão do paciente, mas exige estratégias de monitorização de RMP cada vez mais eficientes. Embora a quantificação da transcrição de *BCR-ABL1* por *RT-qPCR* continue a ser o método padrão utilizado, várias abordagens foram desenvolvidas na última década com o objetivo de

melhorar essa prática. Uma principal limitação é a baixa capacidade de detetar SCL persistente na MO de pacientes com doença residual molecular indetetável sustentada.

A introdução de novas técnicas e a possibilidade de detetar alvos diferentes do transcrito quimérico *BCR-ABL1*, podem melhorar a deteção da doença, em termos de sensibilidade e especificidade, mas requerem uma longa etapa de validação, bem como um processo de padronização antes da sua introdução na prática clínica.

Embora a LMC continue a ser uma das grandes histórias de sucesso no tratamento oncológico moderno, vários desafios permanecem. Avanços nas tecnologias genéticas abrem caminho para a identificação de novos mecanismos de resistência à terapia e progressão da doença, que podem ter o potencial de serem incorporados à monitorização molecular da LMC no futuro.

Referências bibliográficas

1. Osman AEG, Deininger MW. Chronic Myeloid Leukemia: Modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Rev.* 2021;49(March):100825. doi:10.1016/j.blre.2021.100825
2. Schiffer CA. Diagnosis and treatment of chronic myeloid leukemia. *Neoplast Dis Blood.* 2018;90(10):49-68. doi:10.1007/978-3-319-64263-5_5
3. Liesveld JL, Lichtman MA. Chronic Myelogenous Leukemia and Related Disorders. In: Kaushansky K, Prchal JT, Press OW, Lichtman MA, Levi M, Burns LJ, et al., editors. *Williams Hematology*. 9th ed: McGraw-Hill Education; 2016. p. 1437-90.
4. Tompkins HJ. Present and future. *J Relig Health.* 1961;1(1):68-77. doi:10.1007/BF01532014
5. Cortes J, Pavlovsky C, Sauße S. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2021;398(10314):1914-1926. doi:10.1016/S0140-6736(21)01204-6
6. Asnafi AA, Deris Zayeri Z, Shahrabi S, Zibara K, Vosughi T. Chronic myeloid leukemia with complex karyotypes: Prognosis and therapeutic approaches. *J Cell Physiol.* 2019;234(5):5798-5806. doi:10.1002/jcp.27505
7. Carvalho PVB, Lourenço GJ, Zocca M, et al. Expression of p190 BCR-ABL fusion gene in a patient with chronic myeloid leukemia. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003;25(3):173-176. doi:10.1590/s1516-84842003000300009
8. Chan O, Renneville A, Padron E. Chronic myelomonocytic leukemia diagnosis and management. *Leukemia.* 2021;35(6):1552-1562. doi:10.1038/s41375-021-01207-3
9. Sharf G, Marin C, Bradley JA, et al. Treatment-free remission in chronic myeloid leukemia: the patient perspective and areas of unmet needs. *Leukemia.* 2020;34(8):2102-2112. doi:10.1038/s41375-020-0867-0
10. Wiernik PH, Dutcher JP, Gertz MA. Neoplastic diseases of the blood. *Neoplast Dis Blood.* 2018;5:1-1338. doi:10.1007/978-3-319-64263-5
11. Tefferi A, Dewald GW, Litzow ML, et al. Chronic myeloid leukemia: Current application of cytogenetics and molecular testing for diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc.* 2005;80(3):390-402. doi:10.4065/80.3.390
12. Medeiros BC, Possick J, Fradley M. Cardiovascular, pulmonary, and metabolic

- toxicities complicating tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukemia: Strategies for monitoring, detecting, and managing. *Blood Rev.* 2018;32(4):289-299. doi:10.1016/j.blre.2018.01.004
13. Weinschenker Bollmann P, Del Giglio A. Reviewing Basic sciences. 2011;9(2):236-243.
 14. Bortolheiro TC, Chiattoni CS. Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2008;30(April):10-15. doi:10.1590/s1516-84842008000700003
 15. Nag JC, Hui GP, Young JK, et al. Utilization of monolinolein as a substrate for conjugated linoleic acid production by *Bifidobacterium breve* LMC 520 of human neonatal origin. *J Agric Food Chem.* 2008;56(22):10908-10912. doi:10.1021/jf801597t
 16. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *Appendix II: World Health Organization Classification of Tumours of the Haematopoietic and Lymphoid Tissues.*; 2010. doi:10.1002/9781444323160.app2
 17. Sossela FR, Zoppas BC de A, Weber LP. Chronic Myeloid Leukemia: clinical aspects, diagnosis and main changes observed in complete blood count. *Rev Bras Análises Clínicas.* 2017;49(2):127-130. doi:10.21877/2448-3877.201700543
 18. Mishra A, Tripathi K, Mohanty L, Pujari S. Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia in a child: A case Report. *Indian J Hematol Blood Transfus.* 2010;26(3):109-110. doi:10.1007/s12288-010-0042-2
 19. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2015;385(9976):1447-1459. doi:10.1016/S0140-6736(13)62120-0
 20. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc.* 2015;90(10):1440-1454. doi:10.1016/j.mayocp.2015.08.010
 21. Deininger MWN, Goldman JM, Melo J V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96(10):3343-3356. doi:10.1182/blood.v96.10.3343
 22. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leuk Res.* 2010;34(10):1255-1268. doi:10.1016/j.leukres.2010.04.016

23. Deininger MWN. Chronic myeloid leukemia. *Wintrobe's Clin Hematol Fourteenth Ed.* Published online 2018:5260-5323.
24. Izzo B, Gottardi EM, Errichiello S, Daraio F, Baratè C, Galimberti S. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. *Front Oncol.* 2019;9(September):1-12. doi:10.3389/fonc.2019.00833
25. Bennour A, Saad A, Sennana H. Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;97:263-274. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.08.020
26. Bonfim ACS, Anjos BS dos, França KF de C, et al. O papel da citogenética e da biologia molecular no diagnóstico da Leucemia Mieloide Crônica / The role of cytogenetics and molecular biology in the diagnosis of Chronic Myeloid Leukemia. *Brazilian J Heal Rev.* 2022;5(2):5153-5164. doi:10.34119/bjhrv5n2-098
27. Kaleem B, Shahab S, Ahmed N, Shamsi TS. Chronic myeloid leukemia - Prognostic value of mutations. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2015;16(17):7415-7423. doi:10.7314/APJCP.2015.16.17.7415
28. Breccia M, Efficace F, Scalzulli E, et al. Measuring prognosis in chronic myeloid leukemia: what's new? *Expert Rev Hematol.* 2021;14(6):577-585. doi:10.1080/17474086.2021.1938534
29. Ureshino H. Treatment-free remission and immunity in chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2021;113(5):642-647. doi:10.1007/s12185-021-03117-7
30. Fava C, Rege-Cambrin G, Dogliotti I, et al. Early BCR-ABL1 Reduction Is Predictive of Better Event-free Survival in Patients With Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia Treated With Any Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk.* 2016;16:S96-S100. doi:10.1016/j.clml.2016.03.008
31. Houshmand M, Simonetti G, Circosta P, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells. *Leukemia.* 2019;33(7):1543-1556. doi:10.1038/s41375-019-0490-0
32. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol.* 2018;93(3):442-459. doi:10.1002/ajh.25011
33. Vardiman JW. Chronic Myelogenous Leukemia , BCR - ABL1 +. Published online 2009:250-260. doi:10.1309/AJCPUN89CXERVOVH
34. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukaemia stem cell : stemming the tide

- of persistence . Published online 2017. doi:10.1182/blood-2016-09-696013
35. Jackson TH. The Journal. *Br Med J*. 1859;s4-1(148):880. doi:10.1136/bmj.s4-1.148.880-a
 36. Mauro MJ, Druker BJ. STI571: Targeting BCR-ABL as Therapy for CML. *Oncologist*. BCR2001;6(3):233-238. doi:10.1634/theoncologist.6-3-233
 37. Bergantini APF, Castro FA, Souza AM, Fett-Conte AC. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27(2):120-125. doi:10.1590/s1516-84842005000200012
 38. Cumbo C, Anelli L, Specchia G, Albano F. Monitoring of minimal residual disease (Mrd) in chronic myeloid leukemia: Recent advances. *Cancer Manag Res*. 2020;12:3175-3189. doi:10.2147/CMAR.S232752
 39. Hoffbrand AV, Pettit JE VPCML and, Elsevier MDC atlas of clinical hematology. 4th ed.; 233-42 L. 2002. p. No Title.
 40. Gotlib J, Maxson JE, George TI, Tyner JW. The new genetics of chronic neutrophilic leukemia and atypical CML: Implications for diagnosis and treatment. *Blood*. 2013;122(10):1707-1711. doi:10.1182/blood-2013-05-500959
 41. Yeung CCS, Egan D, Radich JP. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: present and future. *Expert Rev Mol Diagn*. 2016;16(10):1083-1091. doi:10.1080/14737159.2016.1227243
 42. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2014;89(5):547-556. doi:10.1002/ajh.23691
 43. Sorel N, Cayssials É, Brizard F, Chomel JC. Actualisation des traitements et du suivi moléculaire dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2017;75(2):129-145. doi:10.1684/abc.2017.1233
 44. Chauhan R, Sazawal S, Pati HP. Laboratory Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia in Patients on Tyrosine Kinase Inhibitors. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2018;34(2):197-203. doi:10.1007/s12288-018-0933-1
 45. Mishra S, Lee Y, Park JW. Direct Quantification of Trace Amounts of a Chronic Myeloid Leukemia Biomarker Using Locked Nucleic Acid Capture Probes. *Anal Chem*. 2018;90(21):12824-12831. doi:10.1021/acs.analchem.8b03350

46. Soverini S, De Benedittis C, Mancini M, Martinelli G. Best Practices in Chronic Myeloid Leukemia Monitoring and Management. *Oncologist*. 2016;21(5):626-633. doi:10.1634/theoncologist.2015-0337
47. Soverini S, Bavaro L, de Benedittis C, et al. Prospective assessment of NGS-detectable mutations in CML patients with nonoptimal response: The NEXT-in-CML study. *Blood*. 2020;135(8):534-541. doi:10.1182/blood.2019002969
48. Shanmuganathan N, Hughes TP. What's NEXT for CML-NGS mutation screening. *Blood*. 2020;135(8):515-516. doi:10.1182/blood.2019004559
49. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-884. doi:10.1182/blood-2013-05-501569
50. Gale RP, Apperley J. What Does Chronic Myeloid Leukaemia Tell Us About Other Leukaemias? *Curr Hematol Malign Rep*. 2019;14(6):477-479. doi:10.1007/s11899-019-00555-3
51. Ren R. MECHANISMS OF BCR – ABL IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC MYELOGENOUS LEUKAEMIA. 2005;5(March):172-183. doi:10.1038/nrc1567
52. Chauffaille M de LLF. Neoplasias mieloproliferativas: Revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2010;32(4):308-316. doi:10.1590/S1516-84842010005000091
53. Ping L, Jian-Jun C, Chu-Shu L, Guang-Hua L, Ming Z. High circ_100053 predicts a poor outcome for chronic myeloid leukemia and is involved in imatinib resistance. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*. Published online 2019:1-18. doi:10.3727/096504018x15412701483326
54. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: The EUTOS score. *Blood*. 2011;118(3):686-692. doi:10.1182/blood-2010-12-319038
55. Pffirmann M, Clark RE, Prejzner W, et al. The EUTOS long-term survival (ELTS) score is superior to the Sokal score for predicting survival in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(8):2138-2149. doi:10.1038/s41375-020-0931-9
56. Marum JE, Branford S. Current developments in molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Ther Adv Hematol*. 2016;7(5):237-251.

doi:10.1177/2040620716657994

57. Passweg JR, Walker I, Sobocinski KA, Klein JP, Horowitz MM, Giralt SA. Validation and extension of the EBMT Risk Score for patients with chronic myeloid leukaemia (CML) receiving allogeneic haematopoietic stem cell transplants. *Br J Haematol*. 2004;125(5):613-620. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04955.x
58. Gary Gilliland D, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-1542. doi:10.1182/blood-2002-02-0492
59. Kim KI, Park J, Ahn KS, et al. Molecular characterization and prognostic significance of FLT3 in CML progression. *Leuk Res*. 2010;34(8):995-1001. doi:10.1016/j.leukres.2009.11.008
60. Baindur-Hudson S, Edkins AL, Blatch GL. Hsp70/Hsp90 organising protein (Hop): Beyond interactions with chaperones and prion proteins. *Subcell Biochem*. 2015;78:69-90. doi:10.1007/978-3-319-11731-7_3
61. Hochhaus A, Breccia M, Saglio G, et al. Expert opinion—management of chronic myeloid leukemia after resistance to second-generation tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia*. 2020;34(6):1495-1502. doi:10.1038/s41375-020-0842-9
62. Boquimpani C, Salles F, Luise I, Pinto S, Bendit I, Andr J. Hematology , Transfusion and Cell Therapy Brazilian chronic myeloid leukemia working group recommendations for discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia in clinical practice. 2022;(xx):1-8. doi:10.1016/j.htct.2022.04.002
63. Radich JP, Hochhaus A, Masszi T, et al. Treatment-free remission following frontline nilotinib in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia: 5-year update of the ENESTfreedom trial. *Leukemia*. 2021;35(5):1344-1355. doi:10.1038/s41375-021-01205-5
64. Athale U, Hijiya N, Patterson BC, et al. Management of chronic myeloid leukemia in children and adolescents: Recommendations from the Children's Oncology Group CML Working Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(9). doi:10.1002/pbc.27827
65. Hsieh YC, Kirschner K, Copland M. Improving outcomes in chronic myeloid leukemia through harnessing the immunological landscape. *Leukemia*. 2021;35(5):1229-1242. doi:10.1038/s41375-021-01238-w
66. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2020;34(4):966-

984. doi:10.1038/s41375-020-0776-2

67. Hehlmann R. The new eln recommendations for treating cml. *J Clin Med*. 2020;9(11):1-15. doi:10.3390/jcm9113671
68. Wang L, Li L, Chen R, Huang X, Ye X. Understanding and monitoring chronic myeloid leukemia blast crisis: How to better manage patients. *Cancer Manag Res*. 2021;13:4987-5000. doi:10.2147/CMAR.S314343
69. Chen Y, Zou J, Cheng F, Li W. Treatment-Free Remission in Chronic Myeloid Leukemia and New Approaches by Targeting Leukemia Stem Cells. *Front Oncol*. 2021;11(October):1-16. doi:10.3389/fonc.2021.769730
70. Colafigli G, Scalzulli E, Di Prima A, et al. Digital droplet PCR as a predictive tool for successful discontinuation outcome in chronic myeloid leukemia: Is it time to introduce it in the clinical practice? *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;157(May 2020):161-164. doi:10.1016/j.critrevonc.2020.103163
71. Fava C, Kantarjian HM, Jabbour E, et al. Failure to achieve a complete hematologic response at the time of a major cytogenetic response with second-generation tyrosine kinase inhibitors is associated with a poor prognosis among patients with chronic myeloid leukemia in accelerated or blast phase. *Blood*. 2009;113(21):5058-5063. doi:10.1182/blood-2008-10-184960
72. Mahon FX, Etienne G. Deep molecular response in chronic myeloid leukemia: The new goal of therapy? *Clin Cancer Res*. 2014;20(2):310-322. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1988
73. Hantschel O. Chronic myeloid leukemia. *HemaSphere*. 2019;3(S2):47. doi:10.1097/HS9.0000000000000254



Unilabs

U. PORTO

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Estágio realizado sob orientação de Doutora Sofia Botelho Moniz, Diretora
Técnica Farmacêutica Especialista em Análises Clínicas

Ana Luísa de Castro Vieira

Outubro 2022



Resumo

Pretende-se com este relatório de estágio descrever, de forma sucinta, todo o trabalho desenvolvido ao longo do meu estágio no laboratório central de Análises Clínicas Unilabs situado na zona industrial do porto, no âmbito do estágio final para a obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

O relatório está organizado por diferentes setores onde estagiei e refiro as determinações executadas, os diferentes equipamentos encontrados e as suas finalidades.

Abstract

This internship report intends, in a succinct way, all the work developed during my internship at the Unilabs Clinical Analysis Center located in the industrial internship area of Porto, without interval from the final internship to the final internship master internship Clinical Analysis by the Faculty of Pharmacy of the University of Porto.

The report is by different sectors where I worked, where I refer to how different determinations were found and how their purposes were organized.

Agradecimentos

À Doutora Sofia Botelho Moniz, pela autorização deste estágio, nesta empresa de prestígio da qual tenho a sorte de fazer parte.

À Andreia Loureiro por ter organizado todo o processo de estágio e por me ter acolhido tão bem.

À Doutora Teresa Faria e Doutor Carlos Mendes, pela ajuda e por serem tão acessíveis sempre que precisei.

Aos responsáveis de cada setor e todos os colegas, por toda a ajuda e amabilidade.

No fundo... um muito obrigada à Unilabs, pela possibilidade de realização de estágio e por adquirir alguma experiência ao lado de colegas muito profissionais e competentes, sempre dispostos a ajudar.

Resumo.....	ii
Abstract.....	iii
Agradecimentos.....	iv
Lista de figuras	vii
Lista de tabelas	x
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xi
1.Introdução	1
1.1 A Unilabs.....	2
2.Setor da triagem.....	3
2.1 Setor da triagem para amostras de sangue	3
2.2. Setor de triagem para amostras de fezes e urina	7
2.2.1 Amostras de urina	8
2.2.1.1 Urinas 24h e urinas minutadas	9
2.2.2 Amostras de fezes	10
2.2.2.1 Pesquisa de sangue oculto	10
2.2.2.2 Calprotectina	12
2.2.2.3 Elastase	13
2.2.2.4 Parasitológico com concentração.....	14
3.Setor do core.....	15
3.1 Cadeia Siemens Atellica	15
3.2 Determinações confirmatórias.....	18
3.3 Subsetor do estudo da coagulação	25
3.4 Siemens Rapidpoint 500	30
3.5 Sebia Capilarys	30
4.Setor de Hematologia	32
4.1 Cadeia Sysmex XN-40.....	36
4.1.1 Hemograma	36
4.2 VS.....	38
4.3 Hemoglobina A1c.....	39

4.4	Helicobacter pylori.....	42
4.5	Eletroforese das hemoglobinas	43
4.6	Testes rápidos	45
4.6.1	Prova de falciformação.....	46
4.7	Espermogramas.....	47
4.8	Validação	48
5.	Setor da Microbiologia.....	51
5.1	Setor da determinação de urinas tipo II	51
5.2	Cultura de amostras	53
5.2.1	Amostras de urina	54
5.2.2	Amostras de fezes	55
5.2.3	Pesquisa de Streptococcus agalactiae	56
5.2.4	Exsudado vaginal/uretral.....	56
5.2.5	Exsudado auricular	59
5.2.6	Exsudado purulento	60
5.2.7	Expetoração.....	61
5.2.8	Pesquisa de Staphylococcus aureus.....	62
5.2.9	Hemoculturas.....	62
5.3	Processamento de amostras.....	63
5.3.1	Equipamento Maldi Biotyper.....	63
5.3.2	Equipamento Walkaway 96 Plus	65
5.3.3	Antibiogramas manuais.....	66
5.4	Equipamento Biomerieux Vitek 2	66
5.5	Coloração de lâminas	67
5.6	Testes rápidos	68
5.7	Parasitológico com concentração.....	69
5.8	Validação	70
6.	Setor das análises especiais.....	71
6.1	Setor para HPLC-ICP-MS	72

6.2	Setor de Imunoensaio	77
6.3	Setor da auto-imunidade e rastreio	82
6.4	Setor de rastreio pré-natal.....	85
6.5	Técnicas manuais	88
7.	Setor da Imunohematoterapia.....	88
7.1	Coombs	88
7.2	Grupos	91
7.3	Transfusões	96
8.	Controlo de qualidade	101
9.	Conclusão.....	102
	Referências.....	103

Lista de figuras

FIGURA 1- UNILABS, RUA MANUEL PINTO DE AZEVEDO 213, 4100-246 PORTO	2
FIGURA 2- EQUIPAMENTO BECKMAN AUTOMATE 2550 PRESENTENO SETOR DA TRIAGEM ...	4
FIGURA 3- EQUIPAMENTO OC-SENSOR PLEDIA PARA DETERMEINAÇÃO DE PSOF	12
FIGURA 4- RESULTADOS DE PSOF	12
FIGURA 5- EXEMPLAR DE EQUIPAMENTO MODULAR SIEMENS ATELLICA	16
FIGURA 6-EQUIPAMENTO VIDAS 3 UTILIZADO EM TESTES CONFIRMATÓRIOS.	19
FIGURA 7-EQUIPAMENTO VIDAS BLEU.....	20
FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO QUE OCORRE EM VIDAS,, ...	20
FIGURA 9- EQUIPAMENTO SIEMNS FUREJIO TENDIGO.	22
FIGURA 10-EQUIPAMENTO COBAS E411.	23
FIGURA 11- EQUIPAMENTO IMMULITE 2000XPI, ...	24
FIGURA 12 -EQUIPAMENTO SYSMEX Cs 5100	26
FIGURA13 -SIEMENS RAPID POINT500..	30
FIGURA14- REPRESENTAÇÃO DE PROTEINAS SEPARADAS POR ELETROFORESE.	31
FIGURA 15- PERFIL ELETROFORÉTICO NORMAL.	32
FIGURA 16-EQUIPAMENTO SYSMEX XN-10	33
FIGURA 17- PARÂMETROS OBSERVADOS NO CANAL WNR.....	33
FIGURA 18-FIGURA 19-PARÂMETROS OBSERVADOS NO CANAL WDF.....	34
FIGURA 19-PARÂMETROS REPORTÁVEIS NO CANAL PLTF.....	35
FIGURA 20-PARÂMETROS REPORTÁVEIS NO CANAL RET: RET E RET-HE	35
FIGURA 21- EQUIPAMENTO CELLAVISION DM 96.....	37
FIGURA 22- EQUIPAMENTO VES-MATIC CUBE 30 TOUCH	38
FIGURA 23- EQUIPAMENTO VES-MATIC CUBE 30..	39
FIGURA 24- RESULTADO DA CROMATOGRAFIA PARA DETERMINAÇÃO DE HEMOGLOBINA GLICADA NORMAL	40
FIGURA 25- EQUIPAMENTO TRINITY HB9210 PREMIER.....	41
FIGURA 26- EQUIPAMENTO HELIPROBE 1.	42
FIGURA 27- EQUIPAMENTO SEBIA CAPILLARYS 2	43
FIGURA 28- GRÁFICO OBTIDO DE EQUIPAMENTO CAPPYLARIS 2	44
FIGURA 29- EXEMPLOS DE TESTES RÁPIDOS EXECUTADOS NO SETOR DE HEMATOLOGIA ...	46
FIGURA 30- PARÂMETROS OBTIDOS A PARTIR DO EQUIPAMENTO CELLAVISION	49

FIGURA 31- EXEMPLO DE PARÂMETROS DE HEMOGRAMA RETIDOS PARA VALIDAÇÃO MANUAL.	49
FIGURA 32- DADOS OBTIDOS A PARTIR DO EQUIPAMENTO CELLAVISON SUGESTIVOS DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA	50
FIGURA 33- AUTOANALISADORES DE URINA SÉRIE UN.	52
FIGURA 34- ACHADOS NA URINA COM IMPORTÂNCIA CLÍNICA	53
FIGURA 35- MEIOS UTILIZADOS PARA CULTURA DE AMOSTRAS	53
FIGURA 36- EXEMPLOS DE BACTÉRIAS QUE PODEM PROVOCAR INFECÇÃO URINÁRIA	54
FIGURA 37- COPROCULTURA NEGATIVA	56
FIGURA 38- COPROCULTURA POSITIVA.	56
FIGURA 39- MEIO DE CULTURA GCCH COM CRESCIMENTO DE NEISSERIA SPP.	57
FIGURA 40- MEIO DE CULTURA SABGC COM CRESCIMENTO DE CANDIDA ALBICANS.	57
FIGURA 41- BACIOS DODERLINE E GARDENERELA SPP EM MEIO COLS+.	58
FIGURA 42- OBSERVAÇÃO AO MICROSCÓPIO DE TRICHOMONAS VAGINALIS.	59
FIGURA 43- CRESCIMENTO DE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .	60
FIGURA 44- CRESCIMENTO DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREOS</i> .	60
FIGURA 45- CRESCIMENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .	61
FIGURA 46- EQUIPAMENTO BIOMERIEUX BACT ALERT UTILIZADO EM HEMOCULTURAS.	63
FIGURA 47-EQUIPAMENTO MALDI BIOTYPER SMART PARA IDENTIFICAÇÃO.	64
FIGURA 48-TARGET UTILIZADO EM MALDI BIOTYPER.PARA IDENTIFICAÇÃO	64
FIGURA 49-EQUIPAMENTO WALKAWAY 96 PARA ANTIBIOGRAMAS	65
FIGURA 50-PAINEL DE ANTIBIOGRAMA POR MICRO DILUIÇÃO.	65
FIGURA 51-EQUIPAMENTO BIOMERIEUX VITEK 2.	67
FIGURA 52-EQUIPAMENTO PARA COLORAÇÃO GRAM DE LAMINAS	68
FIGURA 53- OVOS DE ENTEROBIUS VERMICULARIS	69
FIGURA 54- OVOS DE ASCARIS LUMBRICOIDES E OVO DE TRICHURIS TRICHIURA.	69
FIGURA 55- ESQUEMA EXPLICATIVO DE FUNCIONAMENTO DE TECNICA HPLC	72
FIGURA 56- EQUIPAMENTO API 5000	74
FIGURA 57- EQUIPAMENTO WATERS ACQUITY	74
FIGURA 58- EQUIPAMENTO GILSON	75
FIGURA 59- EQUIPAMENTO HTA HPLC 2	75
FIGURA 60- EQUIPAMENTO SHIMADZU	76
FIGURA 61- EQUIPAMENTO PLASMA QUANT PARA ICP-MS	76
FIGURA 62- EQUIPAMENTO TRITURUS	77
FIGURA 63- EQUIPAMENTO VIRCLIA	78
FIGURA 64-EQUIPAMENTO BN PROSPEC.	79

FIGURA 65-EQUIPAMENTO HYDRASIS..	80
FIGURA 66-EQUIPAMENTO IDS-ISYS.....	81
FIGURA 67-EQUIPAMENTO IMUNOCAP 1000.....	81
FIGURA 68-EQUIPAMENTO VIDAS 3.....	82
FIGURA 69- EQUIPAMENTO EUROBLOTONE.....	83
FIGURA 70- EQUIPAMENTO IMUNOCAP 250.....	83
FIGURA 71- EQUIPAMENTO BYOSYSTEMS IPRO... ..	84
FIGURA 72- EQUIPAMENTO ZENIT RA.....	84
FIGURA 73- EQUIPAMENTO ZENIT UP- PRO....	85
FIGURA 74- EQUIPAMENTO KRYPTOR.....	86
FIGURA 75- EQUIPAMENTO ORTHO AUTOVUE SYSTEM.....	87
FIGURA 76- CASSETES/CARDS UTILIZADAS NO EQUIPAMENTO ORTHOVUE... ..	87
FIGURA 77- “KITS DE CÉLULAS” UTILIZADAS NO EQUIPAMENTO ORTHO AUTOVUE.....	88
FIGURA 78-DOCUMENTO PARA PREENCHIMENTO E INTERPRETAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO DE PAI	90
FIGURA 79- INTERPRETAÇÃO DOS DIFERENTES GRUPOS SANGUÍNEOS EM CARDS	95

Lista de tabelas

TABELA 1- CRONOGRAMA DO ESTÁGIO REALIZADO NA UNILABS	1
TABELA 2- DESCRIÇÃO DA BARRETE VIDAS 3 E PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA ANTI-HEV IGG	21
TABELA 3- VALOR PERCENTUAL DE REFERÊNCIA DAS DIFERENTES PROTEINAS PESQUISADAS EM PERFIL DE ELETROFORESE.....	31
TABELA 4- EXECUÇÃO DA TÉCNICAS MANUAIS DE TESTES NO SETOR	100

Lista de Abreviaturas e símbolos

ACTH-hormona adrenocorticotrófica

APCR-proteína C reativada ativada

APTT-tempo de tromboplastina parcial ativado

AT-III-antitrombina III

BASO#-basófilos valor absoluto

BASO%- basófilos em percentagem

Ca 15,3;19.9 e 125-marcadores tumorais

CMV-citomegalovírus

DHEA-Desidroepiandrosterona

DHEA-SO₄- Sulfato de deidroepiandrosterona

DMAE-dimetilaminoetanol

EBNA-antígeno nuclear Epstein-Barr

EDTA k3-ácido etilenodiamino tetra- acético tripotássico

EIFA-*Enzyme Linked Fluorescent. Assay*

Epo-Eritropoietina

FISH-*Fluorescence in situ hybridization*

FSH-hormona folículo-estimulante

FT4-tiroxina livre

GH- hormona de crescimento

HAV- vírus hepatite A

HIV- vírus imunodeficiência humana

HBS-superfície hepatite b

HCV- vírus hepatite c

Hgb/ml- hemoglobina por mililitro

HPLC-*High performance liquid chromatography*

HTLV-Vírus linfotrópico da célula T humana

ICP-MS-Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente

Ig- fator de crescimento

Igf-I- fator de crescimento I

INR-international normalized ratio

IgA, IgG, IgM -imunoglobulinas tipo A, G e M

ISI-international Scientific indexing

LH-hormona luteinizante

ml- mililitro

Nm-nanometro

NRBC-eritrócitos nucleados

NRBC%- eritrócitos nucleados em Percentagem

NRBC#- eritrócitos nucleados valor absoluto

OMS-organização mundial de saúde

PRL-prolactina

PSA-antigenio específico da próstata

Pco2- pressão de dióxido de carbono

PLT-plaquetas

Po2-pressão de oxigénio

PSOF-pesquisa de sangue oculto nas fezes

PAP- fosfatase ácida prostática

PLT-f-canal plaquetas por fluorescência

Pth-paratormona intacta

Shbg-globulina ligante a hormonas sexuais

RBC-eritrócitos

Ret-he-*reticulocyte haemoglobin equivalente*

Rpm-rotações por minuto

TBG-globulina ligante a tiroxina

Tgo/ast-aspartato aminotransferase

Tgp/alt-alanina aminotransferase

Tp- tempo de protrombina

TT-tempo de trombina

T3-Triiodotironina

T4-tiroxina

UV vis-ultravioleta visível

WBC-*white blood cell*

Vitamina D1,25-1,25-di-hidroxi-vitamina D

3h- 3 horas

24h- 24 horas

25-OH-25-hidróxi-colecalciferol

1. Introdução

O presente relatório é referente ao estágio na Unilabs, Entidade privada, no âmbito do Curso Mestrado em Análises Clínicas, com a duração de 450 horas (Tabela 1) e sob a orientação da Doutora Sofia Botelho Moniz.

O principal objetivo do estágio passou pela integração nos vários Setores laboratoriais, permitindo a consolidação do conhecimento teórico obtido durante o Mestrado e a aquisição de competências laboratoriais.

Tabela 1- Cronograma do estágio realizado na Unilabs

PERÍODO	SETOR
02/05/2022- 13/05/2022	Triagem
16/05/2022- 27/05/2022	Core
30/05/2022- 03/06/2022	Hematologia
06/06/2022- 17/06/2022	Microbiologia
20/06/2022-01/07/2022	Análises especiais
04/07/2022-15/07/2022	Imunohematoterapia

Este relatório pretende descrever resumidamente o fluxo de trabalho nos diferentes setores onde foi realizado o estágio. A primeira secção descreve o setor da triagem, um setor correspondente à pré-analítica. Seguem-se outros setores, como Core, Hematologia, Microbiologia, análises especiais e imunohematoterapia, com descrição dos diferentes equipamentos encontrados para obtenção de resultados e referentes metodologias, assim como uma breve referência sobre o controlo de qualidade interno e externo.

1.1- A Unilabs

O Grupo Unilabs foi fundado em 1987 com três laboratórios de diagnóstico na Suíça: Genebra, Berna e St. Gallen. Nos anos seguintes, cresceu rapidamente com uma estratégia de aquisição de laboratórios parceiros de alta qualidade e excelência ao redor do continente europeu.

A Unilabs (figura 1) é uma empresa europeia líder de testes laboratoriais clínicos e de serviços de diagnóstico clínico integrado, cuja integração em Portugal ocorreu no ano de 2006, após a aquisição de 85% da Medicina Laboratorial Dr. Carlos Torres.

Desde aí, a Unilabs Portugal cresceu rapidamente adotando uma estratégia de aquisição de laboratórios/parceiros de elevada qualidade por todo o país, integrando setores de diagnóstico em Análises Clínicas, Cardiologia, Radiologia, Gastreenterologia, Genética e Medicina Nuclear.

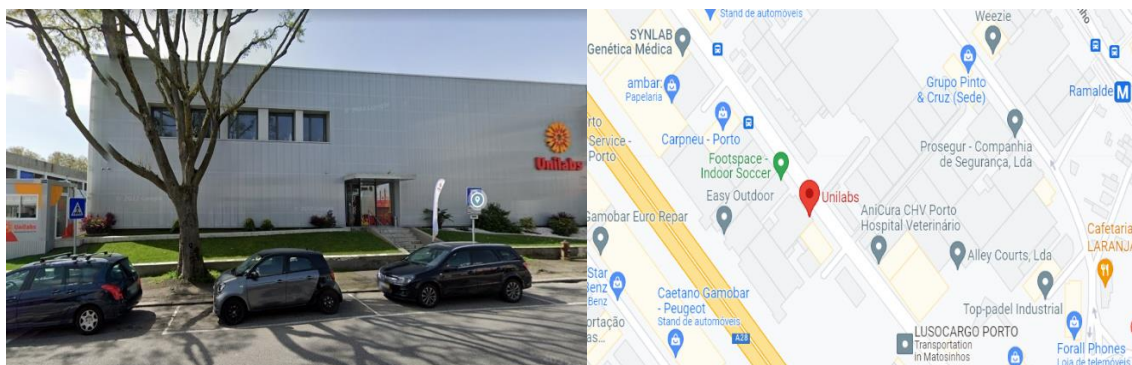


Figura 1- Unilabs, Rua Manuel Pinto de Azevedo 213, 4100-246 Porto.

Imagens retiradas da página <https://www.google.com/maps/place/Unilabs/@41.1721455,-8.6470724,17z/data=!4m5!3m4!1s0x0:0x14d4f33dc40337bc!8m2!3d41.1719759!4d-8.6460317>,
accedida a 28 de Maio de 2022.

Atualmente, o laboratório encontra-se equipado com uma vasta gama de aparelhos automatizados de topo e dispõe de uma rede informática com o programa Clinidata de produção, que corresponde a um sistema de gestão global, que permite a interligação com o sistema informático utilizado nas unidades de colheita, o ARA2, entre os quais, é possível

o registo de colheitas efetuadas aos utentes, verificação de faltas de produtos, verificação de pedidos de nova colheita, validação e envio de resultados para postos de colheita e utentes. O clinidata de produção está interligado também com os *softwares* de cada equipamento.

Relativamente ao controlo de qualidade dos resultados, este é assegurado através da realização de controlos de qualidade internos (CQI), devidamente registados na plataforma *Innovway* e *Unity Real Time*, e pela participação em programas de Avaliação Externa da Qualidade organizados pelo RIQAS (*International Quality Assessment Scheme*) e NEQAS (*External Quality Assessment Services*).

2. Setor da triagem

Neste setor, passam todas as amostras colhidas em todos os postos Unilabs, da zona norte (sensivelmente um volume de cerca de 15.000 amostras diárias), assim como amostras cujas determinações não foram possíveis noutros laboratórios do grupo.

O setor da triagem é subdividido em 2 setores:

- Setor de triagem para amostras de sangue,
- Setor de triagem para amostras de fezes e urina.

2.1- Setor da triagem para amostras de sangue

Este setor dispõe de uma forte componente humana e auxílio de equipamento para tubos de soro com gel separador rotulados como “Automate”, cujo equipamento utilizado é o Beckman Automate 2550 (figura 2).



Figura 2- Equipamento Beckman Automate 2550 presente no setor da triagem.

Imagem retirada da página <https://www.beckmancoulter.com/products/automation/automate-2500-family-sample-processing-systems>, acessada a 3 de junho de 2022.

Este equipamento permite o processamento de amostras agilizando os processos pré e pós-analíticos, utilizando uma solução automatizada. Permite a obtenção de um banco de amostras com máxima eficiência e segurança e maior controlo da sua rastreabilidade.

Neste setor são verificadas todas as amostras de forma a compreender, se os critérios pré-analíticos foram respeitados e posteriormente, as mesmas são direccionadas para os setores correspondentes de forma a serem feitas as determinações analíticas pretendidas.

A Fase Pré-Analítica é considerada a principal fonte de erros laboratoriais, sendo atribuída uma percentagem que se aproxima dos 70%. Esta fase envolve várias etapas, desde a elaboração da requisição médica até à determinação laboratorial, passando pela correta identificação do doente, correto preenchimento da requisição da análise, seleção do tipo de produto biológico mais adequado, procedimento de colheita, transporte da amostra nas condições recomendadas (temperatura, luminosidade, entre outros), realização da análise

nos tempos adequados e pela detecção de possíveis fatores interferentes, etapas estas avaliadas na íntegra por este setor e também por outro setor ligado à pré-analítica, mas com tarefas na área administrativa.

Sendo este setor um setor mais manual, certas características são avaliadas como: presença de fibrinas, correta centrifugação dos tubos, presença de hemólise, observação de amostras lipêmicas, observação de quantidade de amostra, determinações de caráter urgente, armazenamento de amostras extra, verificação de cuidados especiais exigidas para certas amostras e erros de triagem.

Havendo conformidade das amostras, ou seja, se não existirem erros de triagem, todas as amostras neste subsetor são separadas em diferentes grupos, da seguinte forma:

- Tubos de soro com gel separador, determinações rotuladas como “core” e tubos com anticoagulante Citrato de sódio, rotulados como “rotina/coagulação” depois de uma recentrifugação (no caso dos tubos de soro com gel separador) / centrifugação (caso dos tubos com anticoagulante de citrato de sódio) com a duração de 5 minutos a 4000 rpm e 15 minutos a 3450 rpm respectivamente, são encaminhadas para o **Setor Core**.

É de salientar, que qualquer tubo de soro, seja pertencente ao “Core” ou “Automate” tem que ser obrigatoriamente centrifugado nos postos de colheita, no máximo até 2 horas após a colheita, durante 10 minutos a 4000rpm. Caso não seja verificada a centrifugação, a amostra é imediatamente rejeitada e pedida uma nova amostra ao respectivo posto para uma futura determinação.

Apesar de para a determinação de resultados de rotina em tubo de citrato de sódio ser necessária uma centrifugação, a mesma apenas é efetuada no setor da triagem, no momento antes da determinação.

- Tubos de soro com gel separador rotulados como “Automate” e outros cuja realização da análise não seja diariamente executada no laboratório, como por exemplo, vitamina D-1,25 dihidroxicolecalciferol, osteocalcina e desidroepiandrosterona (DHEA), como já foi referido, são encaminhados para o equipamento Beckham Automate 2550.

Este equipamento faz uma separação de amostras em alíquotas, devidamente identificadas, para distribuição nos diferentes setores, amostras estas que poderão sofrer a necessidade de refrigeração ou congelação. As alíquotas resultantes têm como destino o **Setor das Análises especiais** ou o **Setor Core**.

Após todas as separações, este equipamento organiza as amostras de Sangue (e também de urina- provenientes do subsetor de triagem de urinas), em suportes devidamente identificados para posterior armazenamento em arquivo, caso sejam necessárias para determinações pretendidas após colheita ou confirmação, sendo eliminadas após um longo período de tempo.

Neste equipamento passam também os tubos com coagulante citrato de sódio, para estudos de coagulação, cujas análises não são de rotina, e tubos de testes especiais, em que nestes, é feita uma separação de uma pequena quantidade de amostra para alíquotas, cujos rótulos, para além de incluírem o número de amostra (correspondente a um determinado utente), inclui o nome do equipamento responsável pela determinação e respetiva análise ou análises a ser executadas.

- Tubos com anticoagulante EDTA k3 são separados segundo a descrição presente nos rótulos, de forma a facilitar o fluxo de trabalho e a maior parte é encaminhada para o **Setor de hematologia**.

Assim são separados segundo a seguinte descrição em:

- 1) Variantes de hemoglobina
- 2) Grupos Coombs
- 3) Hemoglobina A1c
- 4) Biologia molecular
- 5) Análises gerais de hemograma.

Apesar da descrição presente nos rótulos, são separados também em caso de urgências, presença de hemólise, baixo volume, presença de lipémia e presença de possíveis coágulos.

- testes de sopro para pesquisa de *Helicobacter pylori*, que são encaminhados para o **Setor da hematologia**.

- Tubos cujas determinações pretendidas são: cálcio ionizado, bicarbonatos, gasometrias e álcool etílico - são efetuadas no **Setor Core**.

Outras funções deste setor incluem:

- A comunicação de erros analíticos aos postos (comum aos 2 subsetores)
- Abertura das malas de laboratórios periféricos como Chaves, Vila Real, Sines, Algarve, Braga e Lisboa.
- A verificação da temperatura das malas, congeladores e arcas pertencentes à Unilabs, utilizando um dispositivo de controlo de temperatura aliada a sistemas informáticos, de forma a verificar se o armazenamento das amostras está em conformidade, principalmente a temperatura das malas, no momento de transporte.
- Encaminhamento de amostras para setores exteriores, pertencentes à Unilabs, como o setor da Biologia Molecular e Centro de genética médica.

2.2- Setor de triagem para amostras de fezes e urina

Este setor recebe amostras de urinas e fezes, provenientes dos postos de colheita, em recipientes próprios como:

- Tubos coletores de urina com capacidade de 10 ml com vácuo para extração de amostra a partir dos frascos de urina utilizados no momento da colheita pelo paciente.

- Frascos de urina esterilizados, cuja triagem para os tubos de vácuo não foi possível.
- Frascos de urina 24h, com ou sem ácido nítrico, ácido clorídrico ou carbonato de sódio.
- Frascos de fezes, triplos ou individuais.

Este setor está também responsável pela distribuição de outros tipos de amostras que não fezes e urina, por exemplo amostras de expetoração, amostras de unhas, amostras de esperma (que obrigatoriamente tem que ser colhidas no laboratório central), exsudados vaginais, uretrais, auriculares etc., que normalmente são encaminhadas para os **Setores core, análises especiais, hematologia e microbiologia**.

2.2.1-Amostras de urina

Relativamente às amostras de urina, que normalmente chegam a este setor em tubos coletores, é feita uma separação mediante os rótulos que apresentam:

- Tubos de urina tipo II, que são encaminhados para o **Setor da microbiologia**,
- Tubos de urina para determinação bacteriológica que também são encaminhadas para o **Setor da microbiologia**,
- Tubos de urina, cujo rótulo indique uma passagem pelo **Setor Core**, são centrifugados neste setor previamente durante 5 minutos a 4000rpm.

Após encaminhamento das amostras de urina para os diferentes setores, as mesmas vão sendo verificadas diariamente, de forma a notar a conclusão dos processos analíticos.

Caso as amostras estejam concluídas e presentes neste setor, sofrem uma eliminação. É de salientar, que no momento inicial de triagem, algumas amostras são triadas em duplicado, de forma a ser feita a determinação, assim como uma segunda amostra intacta, que ficará em arquivo, caso posteriormente tenha que ser acedida.

As amostras que não estiverem em fase de conclusão, são verificadas recorrendo às plataformas informáticas, neste caso, ao clinidata de produção, de forma a serem rastreadas e acedidas todas as determinações efetuadas, verificando também, a necessidade de pedido de novas amostras para conclusão das determinações. Neste caso, as amostras presentes neste setor não são eliminadas até ao processo estar concluído, apesar de não serem utilizadas, servindo apenas como controle.

2.2.1.1- Urinas 24h e urinas minutadas

Como já foi referido, a este setor chegam amostras de urina 24h, ou minutadas, por exemplo para determinações de 3h, conforme solicitado pelo clínico.

Nestas amostras são verificadas algumas características como:

- Volume da amostra, que segue alguns padrões de confirmação, uma vez que pelo volume apresentado, as condições de colheita podem não ter sido respeitadas.

Neste caso, para urinas 24h, volumes inferiores a 400ml e superiores a 4000ml são sempre confirmadas com os utentes, antes das determinações. Para urinas minutadas de 3h, no caso de o volume apresentado ultrapassar os 300ml, o mesmo é confirmado com o utente para se proceder à determinação.

Como exemplos de colheita incorreta tem-se: forçar a ingestão de líquidos para a recolha de urina, não esvaziar a bexiga antes de iniciar o período de recolha, não respeitar o tempo imposto para a colheita, etc.

- Preenchimento de informação complementar como peso e altura.
- Verificação da acidificação das amostras
- Verificação da identificação da amostra e posterior reimpressão para controlo de análises não concluídas.

Após verificação destes parâmetros, todas as amostras de urina 24h ou minutadas são pesadas, inseridos todos os dados no sistema informático e retirada uma amostra de 10

ml ou para alíquotas, para encaminhar ao respectivo setor que fará a determinação dos resultados.

2.2.1.2-Amostras de urina de não rotina

Apesar de amostras de urina ditas de rotina, como foram discriminadas até aqui, este setor também é responsável por receber amostras de não rotina, como é o caso de urinas para pesquisa de drogas. Nestes casos, apenas se os procedimentos de colheita e de envio das amostras respeitarem todas as regras impostas pelo laboratório, posteriormente serão encaminhadas para uma determinação qualitativa no setor de hematologia.

2.2.2-Amostras de fezes

Relativamente às amostras de fezes recebidas neste setor, deve ser verificada a conformidade da amostra, nomeadamente a colheita no contentor descrito, volume de amostra e quando aplicável, cumprimento das condições de conservação e transporte.

Apesar da separação e preparação das amostras, como acontece com as amostras de urina, também pode ser feito um processamento das amostras e determinação, como acontece para a pesquisa de sangue oculto. No caso de análises parasitológicas, determinação da calprotectina e elastases, a amostra é preparada antes de ser enviada aos setores a que são destinados para a determinação.

Outras amostras de fezes, cuja preparação não seja necessária, é enviado diretamente o contentor para o setor respetivo, normalmente o **Setor da microbiologia**.

2.2.2.1-Pesquisa de sangue oculto

A deteção de sangue oculto nas fezes consiste num teste rápido para deteção qualitativa de sangue nas fezes humanas. É útil para identificar lesões no trato gastrointestinal, quando o sangramento não é clinicamente visível, e muitas vezes esta pequena quantidade de sangue nas fezes pode ser o primeiro sinal de cancro do cólon, sendo considerado um

método de rastreio. Existem também algumas alterações benignas que levam ao aparecimento de sangue nas fezes.

Para pesquisa de sangue oculto nas fezes, é necessário ler o código de barras do contentor, cuja finalidade é serem emitidas as etiquetas necessárias de acordo com os exames associados.

Perante um contentor triplo, é necessário:

1. identificar o coletor com o rótulo correspondente ao *pool* das 3 amostras,
2. retirar a tampa do coletor e introduzir a tira várias vezes em cada uma das 3 amostras,
3. Colocar no coletor,
4. Agitar o coletor, invertendo algumas vezes com suavidade de forma a não criar bolhas.

Perante um contentor simples, é necessário:

1. Identificar o coletor com o rótulo da amostra,
2. Retirar a tampa do coletor e introduzir a tira várias vezes na amostra,
3. Colocar no coletor,
4. Agitar o coletor, invertendo algumas vezes com suavidade de forma a não criar bolhas.

Posteriormente o coletor é colocado no equipamento OC-Sensor PLEDIA (figura 3). Este equipamento é totalmente automatizado para pesquisa de sangue oculto (PSOF). A operação é simples, basta colocar as amostras nas raques de forma a serem lidos os rótulos e pressionar o botão "*start*" para realizar a análise. Utiliza como princípio, a Imunoturbidimetria de aglutinação em látex, cujo marcador testado é a hemoglobina humana.

Posteriormente são impressos os dados referentes a cada amostra (figura 4), em que, no caso da determinação ser superior a 50 ng Hgb/mL é considerado positivo.



Figura 3- Equipamento OC-Sensor PLEDIA para determinação de pesquisa de sangue oculto nas fezes.

Imagem retirada da página https://www.google.com/search?q=oc+sensor+pledia&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT815PT816&sxsrf=ALiCzsbR7SRzUFsB3_PBD4i2BR6drVFDugA:165928_2398173&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKE_wisuLLPvKP5AhUehP0_HHZUE_B1AQAUoAXoECAEQAw&biw=1536&bih=722&dpr=1.25#imgsrc=dBI_nlBypIAs1M, acedida a 12 de junho de 2022.

***** STD-QC START *****	035-01	00001	101 ng/mL
***** QC C1/C2 *****	035-02	00002	4 ng/mL
097-09 C-99991	035-03	00003	11 ng/mL
165 ng/mL	035-04	00004	5 ng/mL
140 ng/mL	035-05	00005	14 ng/mL
144 ng/mL	035-06	00006	11 ng/mL
13.40	035-07	00007	8 ng/mL
150 ng/mL	035-08	00008	2 ng/mL
9.0	035-09	00009	0 ng/mL
097-10 C-99992	035-10	00010	3 ng/mL
445 ng/mL			
447 ng/mL			
433 ng/mL			
442 ng/mL			
7.57			
035-01	00001		101 ng/mL
+			

Figura 4- resultados de pesquisa de sangue oculto nas fezes. A) resultados de controlo de qualidade e resultado positivo. B) resultado 1- positivo, restantes negativos.

2.2.2.2- Calprotectina

A calprotectina é uma proteína libertada pelos neutrófilos, que se deslocam até ao trato gastrointestinal quando há inflamação, assim pode ser encontrada nas fezes em grande

concentração, em casos de sintomas indicativos de doenças intestinais, como sangue nas fezes, cólica abdominal, febre e perda de peso.

Para a preparação das amostras é necessário respeitar o seguinte procedimento:

1. Identificar o tubo de extração com o rótulo da amostra,
2. Retirar a tampa do tubo e inserir a tira várias vezes na amostra até que os 4 anéis na extremidade estejam completamente cobertos de amostra,
3. Colocar a tira no tubo e enroscar a tampa,
4. Homogeneizar em vortex e incubar 10 minutos até à dissolução completa da amostra,
5. Retirar a tampa e descartar a mesma,
6. Transferir o conteúdo do tubo para um eppendorf e centrifugar cerca de 5 minutos a 3000g,
7. Retirar o sobrenadante para o eppendorf e descartar o restante.

Posteriormente, estas amostras preparadas são enviadas para o **Setor das análises especiais**.

2.2.2.3-Elastase

A elastase é uma enzima, cuja pesquisa e quantificação é não invasiva, realizada a partir de amostras fezes, com a finalidade de avaliar a função pancreática exócrina.

Para a preparação das amostras é necessário respeitar o seguinte procedimento:

1. Identificar o tubo de extração com o rótulo da amostra,
2. Retirar a tampa do tubo e inserir a tira várias vezes na amostra até que os 4 anéis na extremidade estejam completamente cobertos de amostra,
3. Colocar a tira no tubo e enroscar a tampa,
4. Homogeneizar em vortex durante 2 minutos até dissolução completa da amostra,
5. Incubar 15 minutos,
6. Repetir os pontos 4 e 5.

Posteriormente, à semelhança do que acontece com as amostras para a pesquisa de calprotectina, estas amostras preparadas também são enviadas para o **Setor das análises especiais**.

2.2.2.4-Parasitológico com concentração

Os parasitas intestinais incluem vários microrganismos, como vermes e protozoários, transmitindo-se principalmente pela via fecal-oral. Em casos de suspeita clínica de parasitose intestinal, o exame parasitológico de fezes é essencial para a determinação do agente etiológico.

Para esta análise, as fezes devem ser recolhidas e entregues rapidamente ao laboratório. Depois da recolha, deve-se avaliar o aspeto da amostra, a sua consistência, a sua cor, pesquisar vermes adultos e observar ao microscópio, após concentração.

Para a preparação das amostras é necessário respeitar o seguinte procedimento:

1. Observar macroscopicamente as fezes para a deteção de vermes adultos,
2. Identificar o tubo de extração com o rótulo da amostra,
3. Retirar a tampa do tubo e colocar uma pequena quantidade de fezes,
4. Com a espátula da tampa dissolver suavemente a amostra evitando que a mesma saia do limite do líquido,
5. Retirar a tampa e adicionar 1,5ml de Lugol 5%,
6. Enroscar o tubo cónico no tubo de extração,
7. Agitar em vortex, com o tubo cónico voltado para baixo, durante cerca de 15 segundos,
8. Agitar verticalmente o tubo para transferir o líquido restante,
9. Deixar repousar cerca de 1 a 2 minutos,
10. Centrifugar 5 minutos a 1500g.

Posteriormente, estas amostras preparadas são enviadas para o **Setor da microbiologia**.

Sendo a Unilabs um laboratório de excelência, utiliza várias estratégias informáticas para assegurar o correto funcionamento de fluxo das amostras de setor para setor, desde o momento da colheita realizada em postos, até à fase final de validação do boletim analítico.

3. Setor do core

Este setor recebe amostras de sangue colhidas em tubos de soro com gel separador rotulados como “core” das quais fazem parte a maioria das análises de rotina num laboratório, amostras em tubo com anticoagulante citrato de sódio (análises de coagulação de rotina e coagulação de não rotina), amostras de urina rotuladas como “bioquímica” e algumas alíquotas congeladas previamente, de amostras de sangue colhidas em tubo de soro com gel separador rotuladas como “automate” de análises que tem como destino, equipamentos da imunoquímica, que não integram na cadeia, denominados equipamentos periféricos utilizados como auxiliares ou confirmatórios.

3.1- Cadeia Siemens Atellica

Todas as amostras, exceto as amostras presentes em alíquotas congeladas, são colocadas num equipamento complexo, Siemens Atellica (figura 5) que integra analisadores de imunoquímica e química clínica. Estes analisadores estão divididos em 4 linhas, 3 das quais compreendem os analisadores de imunoquímica e bioquímica, e uma das linhas, interligada a este equipamento, é destinada apenas para o estudo da coagulação, que corresponde ao equipamento Sysmex cs 5100.



Figura 5- Exemplar de equipamento modular Siemens Atellica presente no setor.

Imagem retirada da página https://www.google.com/search?q=siemens+atellica&rlz=1C1NDCM_pt-P TPT815PT816&s_xsr=ALiCzsYzF6gDxmIqAI8KS0EL1_yyY_CkTezg:1659285511_708&so_urc_e=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiv6oWcyK_P5AhVJrxoKHTv_9C68QAUoAX_oECAIQAw&biw=1536&bih=722&dpr=1.25#imgsrc=UurcP3jTjaV6oM, acessada a 1 de julho de 2022.

As amostras são então colocadas no início da cadeia, cujos rótulos são lidos e identificadas as análises a serem executadas. Consequentemente, e consoante o tipo de análises pedidas em cada tubo, as amostras são direcionadas para uma determinada linha, que está programada, pelo tipo de análises pretendidas e quantidade a entrar em cada uma das linhas, de forma a evitar tempos de espera para as determinações analíticas.

Os procedimentos diários destinados aos equipamentos responsáveis pelas determinações bioquímicas e de imunoquímica são as seguintes:

1. Realizar as manutenções dos equipamentos. (A manutenção semanal inclui limpeza da sonda com solução de hipoclorito de sódio, e limpeza com *Capiclean*),
2. Registrar no *Innovway* as manutenções executadas,
3. Proceder ao carregamento de reagentes e consumíveis,
4. Executar e validar o CQI no programa *Unity Real Time* ou verificar e validar o CQI, executado automaticamente ao início da manhã no mesmo programa,
5. Verificar a validade das calibrações e efetuar as calibrações necessárias,

6. Controlar os testes calibrados e os segundos packs (dado o grande volume de amostras, é necessário assegurar todas as calibrações ao início do dia),
7. Rever os resultados no *Unity Real Time*, registar todas as alterações, correções efetuadas (repetições de controlo, calibrações, trocas de packs, novos lotes).

Nos equipamentos destinados a determinações bioquímicas, podem ser por:

1. Bioquímica por espectrofotometria, cujas análises executadas são: proteínas totais, bilirrubina total e conjugada, ferro, magnésio, fósforo, ureia, azoto ureico, cálcio, ácido úrico, glicose, lítio, etanol, amónia e albumina.
2. Bioquímica por espectrofotometria/enzimático, cujas análises executadas são: fosfatase alcalina, transaminases TGO (transaminase oxalacética/AST- aspartato aminotransferase) e TGP (transaminase pirúvica/ALT -alanina aminotransferase), creatinofosfoquinase, gamaglutamiltransferase, lactato desidrogenase, lípase, amílase, creatitina, colesterol, colesterol HDL, glicose e triglicerídeos.
3. Bioquímica por imunoturbidimetria cujas análises executadas são: transferrina, proteína c reativa e albumina na urina.
4. Bioquímica por potenciometria de cloretos seletivos cujas análises executadas são: sódio, potássio, cloretos (ionograma) e ionograma(urina).

Nos equipamentos destinados a determinações imunoquímicas, podem ser por:

1. Bioquímica por método de imunoensaio de quimioluminescência no soro, cujas análises executadas são: hormona folículo-estimulante (FSH), hormona luteínizante (LH), prolactina (PRL), hormona tireoestimulante (TSH), Triiodotironina (T3), tiroxina (T4), tiroxina livre (FT4), estradiol, progesterona, testosterona, paratormona intacta (PTH), CA125, CA15.3, CA19.9, antigénio carcinoembrionário

(CEA), cortisol, ferritina, mioglobina, troponina I, 25-OH vitamina D, antígeno prostático específico (PSA), antígeno prostático específico livre.

2. Imunologia por imunoturbidimetria cujas análises executadas são: fator reumatoide e imunoglobulina tipo A (IgA), imunoglobulina tipo M (IgM) e imunoglobulina tipo G (IgG).
3. Microbiologia serológica e antigénica por métodos de imunoensaio de quimioluminescência no soro cujas análises executadas são: hepatite C-HCV, hepatite B -anticorpo anti HBS e antígeno HBS, hepatite A- anticorpo HAV igM, anticorpo rubéola IgM e IgG, anticorpo toxoplasma gondii IgM e IgG, HIV 1 e 2, anticorpo IgG anti-Sars-cov2.

3.2- Determinações confirmatórias

Certos testes, principalmente os efetuados por métodos de imunoensaio de quimioluminescência, após passarem na cadeia Siemens Atellica, passam por outra etapa de determinação de resultados. Neste caso, são efetuados os resultados confirmatórios e validados conforme as regras internas do laboratório.

Estes testes confirmatórios podem ser efetuados no equipamento Vidas 3, Immulite 2000 e Fujirebio Tendigo.

No equipamento Vidas 3 (figura 6), são efetuadas determinações de microbiologia serológica e antigénica por método de imunoensaio *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA), cujos testes confirmatórios executados correspondem a: Hepatite B, antígeno HBS, HBC total, anticorpo rubéola IgM, anticorpo toxoplasma gondii IgM e IgG, HIV 1 e 2 e CMV IgM.



Neste equipamento também são feitas determinações que não passam no equipamento Siemens Atellica, como pesquisa de HEV e *Borrelia burgdorferi* (responsável pela doença de Lyme), provenientes de alíquotas separadas no setor da triagem no equipamento Automate.

Neste equipamento pode ser efetuada a avidéz de *toxoplasma gondii* e CMV para anticorpos IgG. O teste de avidéz para IgG, consiste na interação entre anticorpos e antígenos multivalentes. Essa união entre anticorpos e antígenos é realizada através de ligações químicas e o termo que define a força destas ligações é denominado avidéz.

Figura 6- Equipamento Vidas 3 utilizado em testes confirmatórios.

Imagem retirada da página <https://www.biomerieux.pt/produto/vidasr-3>, acedida a 1 de julho de 2022.

Na resposta imunológica primária, os anticorpos desencadeados por um estímulo antigénico apresentam, inicialmente, baixa avidéz, enquanto que numa fase crónica ocorre a situação contrária.

Podem ser encontradas as seguintes situações:

- Avidéz Baixa – Sugere infeção recente a menos de 4 meses,
- Avidéz Moderada – Não exclui uma infeção recente,
- Avidéz Elevada – Infeções adquiridas há mais de 4 meses.

Como já foi referido anteriormente, o equipamento VIDAS 3 é baseado na técnica de ELFA, à semelhança do equipamento Vidas Bleu (figura 7), mas neste equipamento apenas são feitas determinações de de procaltitonina e D- dímeros.



O princípio do teste associa o método “sanduíche” imunoenzimático de duas etapas com uma detecção final em fluorescência (ELFA), são testes qualitativos para a detecção de anticorpos IgM ou IgG contra um determinado agente no soro ou no plasma humano.

Figura 7- Equipamento Vidas Bleu.

Imagem retirada da página <https://fr.bimedis.com/biomerieux-mini-vidas-m33418>, acessada a 1 de julho de 2022.

O cone SPR (figura 8) serve tanto de fase sólida como de suporte de pipetagem. Os outros reagentes da reação imunológica estão prontos a ser utilizados e pré-repartidos no “barrete”. Todas as etapas do teste são efetuadas automaticamente no aparelho. O meio de reação é aspirado e dispensado várias vezes do cone SPR. O Anticorpo (em estudo) presente na amostra é capturado pelo antigénio que reveste o interior do cone SPR. As etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados.

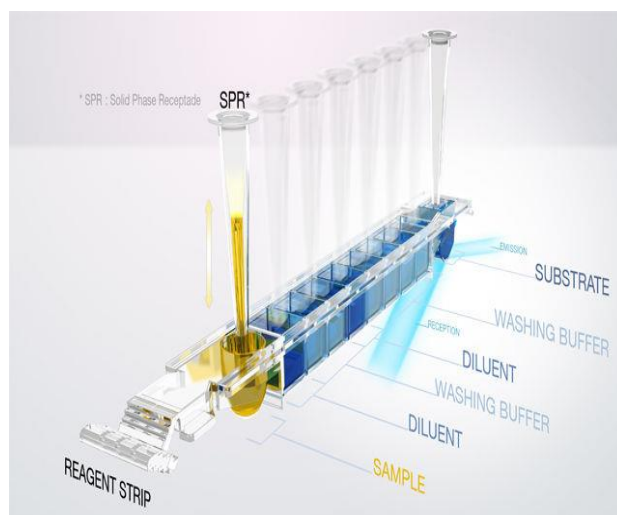


Figura 8- Representação de barrete Vidas Bleu

Imagem retirada da página <https://www.biomerieux.pt/produto/solucao-vidasr>, acessada a 1 de julho de 2022.

No caso de pesquisa do vírus HEV IgG, o Anti-HEV IgG é especificamente detetado pelo anticorpo anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina (conjugado). Novamente, as etapas de lavagem eliminam os componentes não fixados. Durante a etapa de detecção final, o substrato (4-metil-umbeliferil fosfato) é aspirado e dispensado pelo cone SPR. A enzima do conjugado catalisa a hidrólise deste substrato num produto final fluorescente (fosfato de 4-metilumbeliferona), cuja fluorescência é medida a 450 nm.

O valor do sinal de fluorescência é proporcional à concentração de anticorpo presente na amostra. Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente pelo aparelho em relação à curva de calibração e ao Calibrador memorizados e, em seguida, impressos.

A barrete é composta por 10 poços cobertos com uma folha de alumínio selada e etiquetada. A etiqueta contém um código de barras com informação relativa ao código do teste, ao número de lote e ao prazo de validade do kit. O primeiro poço apresenta uma parte perfurada para facilitar a introdução da amostra. O último poço é uma cuvete que permite a leitura em fluorimetria. Os poços intermédios contêm os diferentes reagentes necessários à análise.

Tabela 2- Descrição da barrete Vidas 3 e procedimento analítico para Anti-HEV IgG

Poço	Reagentes
1	Poço-amostra: colocar 100 µL de calibrador, de controlo ou de amostra.
2	Diluyente da amostra: tampão + conservantes (600 µL).
3-4-5-7-8	Tampão de lavagem: tampão + conservantes (600 µL).
6	Conjugado: anticorpo anti-IgG humana marcado com fosfatase alcalina + conservantes (400 µL).
9	Poço vazio.
10	Cuvete de leitura com substrato: 4-metil-umbeliferil fosfato (0,6 mmol/L) + dietanolamina (DEA) (0,62 mol/L ou 6,6%, pH 9,2) + 1 g/L de azida sódica (300 µL).

Retirado de procedimento analítico

O equipamento Fujirebio Tendigo (figura 9), também é utilizado para testes confirmatórios de HCV e HIV 1 e 2 e utiliza a técnica de *imunoblot* com testes INNO-LIA.

A interpretação do INNO-LIA é automatizada na medida em que se verificam controles sobre as tiras para verificar que a amostra foi adicionada, avalia se o procedimento foi realizado corretamente e analisa a intensidade das reações nas linhas de antigénios.



Figura 9- Equipamento Siemens Furejo tendigo.

Imagem retirada da página https://www.google.com/search?q=siemens+tendigo+&tbm=i_sch&ved=2ahUKEwiHvfmm1aP5AhUHw4UKHYIGCMwQ2cCegQIABAA&oq=siemens+tndigo+&gs_lcp=CgNpbWcQAzoECCMQJ1DQBVYkgFgzJYBaABwAHgAgAH1AYqBSAQY1LjEyLjGyAQcQAQgQAQnd3Mtd2l6LWltZ8ABAQ&scient=img&ei=wL3mYofdDYeGiwSCjaDqDA&bih=722&biw=1536&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT815PT816#imgsrc=tJFm_5mei9zFD_5M&img_dii=Xh9Ggn6MZS5DM, acessado a 31 de julho de 2022.

Outro equipamento responsável por determinações de imunoquímica após a passagem das amostras na linha de imunoquímica no equipamento Siemens Atellica, é o analisador Cobas e411 (figura 10) para testes de imunoensaio, que utiliza um sistema de disco.



O analisador cobas e411 é um analisador totalmente automatizado que utiliza uma tecnologia eletroquimioluminescente para análise de imunoensaios. Tem a capacidade de executar determinações quantitativas e qualitativas de ensaios *in vitro*. Este equipamento é utilizado para determinar análises como: hormona anti mülleriana, CA125, CA72.4, cortisol, herpes simplex, vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) I e II, enolase neuroespecífica, osteocalcina e Troponina I.

Esta técnica de “*sandwich*” de antígeno duplo, compreende dois períodos de incubação, em que na 1ª incubação com antígenos recombinantes específicos, reage com um anticorpo específico marcado com complexo de ruténio, formando um complexo *sandwich* e na 2ª incubação são adicionadas micropartículas

Figura 10- Equipamento Cobas e411.

Imagem retira da página <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/cobas-e-411-ins-502.html> , acedida em 31 de julho de 2022.

revestidas de estreptavidina, em que o complexo formado liga-se á fase sólida pela interação biotina-estreptavidina, uma vez que são fixados magneticamente á superfície do eletrodo. Os elementos não ligados são removidos com *procell*.

A aplicação de uma corrente elétrica ao eletrodo, induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador. Os resultados são determinados automaticamente pelo *software* comparando o sinal de eletroquimioluminescência obtido do produto de reação da amostra com o valor de *Cut-off* anteriormente obtido pela calibração.

À semelhança do equipamento Cobas e411, o equipamento Immulite 2000xpi+ versacell (figura 11), executa imunoensaios quimioluminescentes, em que são utilizadas esferas revestidas, para determinação de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), globulina fixadora de tiroxina(TBG), gastrina, cortisol, androstenediona, hormona corticotrofina (ACTH), CMV IgG, HCG na urina, hormona de crescimento (GH), beta 2 microglobulina, beta hcg livre, anticorpos IgG Anti antigénio Nuclear de EPSTEIN BARR (EBNA), eritropoetina (EPO), calcitonina, proteína 3 de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (igFbp-3), Fosfatase Ácida Prostática (PAP), peptídeo c, dihidroepiandrosterona sulfato (DHEA-so4) e globina que liga hormonas sexuais (SHBG).



Figura 11- Equipamento Immulite 2000xpi.

Imagem retirada da página <https://www.siemenshealthineers.com/pt/immunoassay/systems/immulite-2000-xpi-immunoassay-system>, acedida a 31 de julho de 2022.

O princípio de funcionamento deste equipamento consiste num sistema que utiliza esferas de poliestireno revestidas com anticorpo ou antigénio específicos para cada ensaio, com fase sólida e uma fase líquida. A amostra vai incubar com um reagente marcado com fosfatase alcalina, com sucessivas lavagens e a esfera vai ficar no tubo de reação com quantidade residual de marcador não ligado. É quantificado o marcador ligado, que utiliza o substrato de dioxetano para produzir luz. A luz é emitida quando o substrato quimioluminescente reage com a marcação de fosfatase alcalina ligada à esfera. A quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de analito originalmente presente na amostra. A emissão de luz é detetada pelo tubo fotomultiplicador e os resultados calculados para cada amostra.

A nível de calibração, podem ser utilizados dois calibradores que podem ser um nível baixo e um nível alto com diferentes concentrações de analito, ou ser apenas utilizado um 1 nível. Os controlos são executados para determinar se as calibrações são válidas e verificar se o reagente e as esferas são viáveis.

3.3- Subsetor do estudo da coagulação

Como já foi referido, o Subsetor da coagulação está interligado à cadeia Siemens Atellica. Este subsetor está destinado ao estudo da hemóstase, cujo método de coagulometria utiliza uma deteção óptica no plasma.

Este subsetor é responsável pelas determinações de:

- análises de coagulação de rotina (tempo de tromboplastina parcial ativado-APTT, tempo de protrombina ou terapia anticoagulante- TP, fibrinogénio e Tempo de trombina-TT),
- análises de coagulação de não rotina (Resistência do Fator V à Proteína C ativada -aPCR, antitrombina III -AT III, fator de von Willebrand, anticoagulante lúpico, proteína c da coagulação, proteína s variante livre e proteína s funcional.

O equipamento utilizado para estas determinações é o Sismex Cs5100 (figura 12), em que dos 2 equipamentos disponíveis, são feitas as manutenções necessárias, na medida em que:

- No equipamento reservado para as análises de rotina se colocam os reagentes individuais para as análises realizadas, reagentes auxiliares como OVB, CA clean A-1 e CA clean A-2 e a calibração é feita sempre que iniciado um lote novo, porque após esta calibração inicial, o equipamento faz uma calibração automática diariamente. Os calibradores necessários correspondem a 5 frascos de PT multicalibrador, para determinação da análise de tempo de protrombina, e um frasco de SHP (plasma humano standard) para as restantes análises de rotina. São utilizados 3 níveis de controlo da Biorad (alto, baixo e normal).

- No equipamento reservado para as análises de não rotina, o calibrador utilizado corresponde apenas ao calibrador SHP e como controlos utiliza 2 níveis (normal e patogénico) e a nível de calibração diária funciona como o equipamento utilizado para as determinações de análise de coagulação de rotina.



Figura 12-Equipamento Sysmex Cs 5100.

Imagem retirada de <https://www.siemens-healthineers.com/br/hemostasis/systems/sysmex-cs-5100-system>,
accedida a 31 de julho de 2022.

O Sistema Sysmex CS-5100 tem uma tecnologia de Integridade Pré Analítica da Amostra, pois tem a capacidade de identificação e gestão de amostras inadequadas, antes de realizar o teste. As verificações automatizadas de volume de amostras e a deteção qualitativa da hemólise, icterícia e lipemia, minimizam a necessidade de inspeção manual de amostras.

- A verificação do volume primário da amostra identifica potenciais inexatidões causadas pela colheita inadequada da amostra,
- hemólise, icterícia e lipemia com um leitura pré-analítica de amostras de pacientes são detetadas em 3 comprimentos de onda: 450 nm, 575 nm e 600 nm;

APTT

O tempo parcial de Tromboplastina ativado (APTT), um procedimento de triagem global, é utilizado prioritariamente para avaliar anomalias do sistema de coagulação endógeno no percurso intrínseco e deteta, igualmente, deficiências funcionais graves de fatores II, V, X ou de fibrinogénio. A determinação do APTT consiste num teste reconhecido universalmente para a monitorização da terapia da heparina não fracionada, sendo que o prolongamento do tempo de coagulação é proporcional ao nível de heparina.

Para a determinação de APTT é utilizado o Dade Actin FS Reagente, que é utilizado no equipamento mencionado, em que a incubação de plasma com a quantidade otimizada de fosfolípidos e um ativador superficial que compõem o reagente, leva à ativação dos fatores do sistema de coagulação endógeno. O processo de coagulação é desencadeado com a adição de íons de cálcio e é medido o tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina.

Fibrinogénio

Níveis baixos de fibrinogénio encontram-se nos casos de hipofibrinogenia ou afibrinogenemia adquiridas ou hereditárias. Os estados de deficiência adquirida de fibrinogénio ocorrem, especialmente, na sequência de proteólise intravascular do fibrinogénio provocada pela trombina (coagulopatia de consumo, p. ex., em obstetrícia, após intervenções cirúrgicas), veneno de serpente ou plasmina (hiperfibrinólise primária após terapia com estreptoquinase ou uroquinase).

Para a determinação do fibrinogénio é utilizado o Dade Reagente, de forma automatizada ou manual, no plasma e acelerar a coagulação de amostras anti coaguladas para estudos de imunohematologia, na medida em que a enzima trombina converte a proteína plasmática solúvel fibrinogénio no seu polímero não solúvel, a fibrina. O tempo de coagulação do plasma diluído é inversamente proporcional à concentração de fibrinogénio no plasma.

Tempo de trombina

A determinação do tempo de trombina com o teste reagente de trombina é adequada para:

1. monitorização da terapia fibrinolítica,
2. como rastreio das perturbações da formação da fibrina ou em caso de suspeita de estados graves de deficiência de fibrinogénio,
3. diferenciação entre o prolongamento do tempo de trombina induzido pela heparina e as perturbações de formação da fibrina.

O prolongamento do tempo de trombina é medido tanto nas perturbações de polimerização da fibrina como em presença da trombina. A diferenciação consegue-se usando o reagente de batroxobina.

Princípio do método: a trombina converte o fibrinogénio contido na amostra em fibrina através do qual se produz o coágulo. É medido o tempo que decorre até à formação do coágulo.

Tempo de protrombina

A medição do tempo de TP com Reagente Thromborel S constitui um teste de triagem rápido e sensível para detetar perturbações da coagulação a nível extrínseco (fatores II, V, VII e X).

Princípio do método - o processo de coagulação é desencadeado mediante a incubação do plasma com quantidades ótimas de tromboplastina e cálcio. Mede-se o tempo que decorre até à formação do coágulo de fibrina.

O TP é geralmente utilizado para a monitorização da terapêutica anticoagulante oral. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a indicação dos valores de TP em "*International Normalized Ratio*" (INR). O INR é calculado através do ISI (*International Sensitivity Index*) e do MNPT (média de tempo de protrombina normal).

Como calibrador é utilizado o Multicalibrador TP PT-Multi, Conjunto de calibradores para a calibração direta do tempo de protrombina (PT) em INR e em % da norma. Para a determinação de um valor ISI local. O PT-Multicalibrador pode ser utilizado manualmente ou em analisadores de coagulação automatizados.

Proteína C

A proteína C é um inibidor da coagulação dependente da vitamina K, que regula a atividade dos Fator V e Fator VIII.

Princípio do método - a proteína C da amostra do paciente é ativada com um ativador específico de veneno de serpente. A proteína resultante C ativada é determinada com um teste cinético medindo o aumento da absorbância a 405 nm.

Proteína S

A proteína S, uma proteína plasmática dependente da vitamina K, é o cofator da proteína C ativada e estimula a inativação proteolítica dos fatores V ativado e VIII ativado através da proteína C ativada e, dessa maneira, o seu efeito inibidor da coagulação.

Princípio do método - a proteína C ativada produz a degradação proteolítica do Fator V ativado originado pelo veneno da *Vipera russelli* durante a ativação da cascata da coagulação. Neste caso, a proteína S atua como cofator que acelera a reação. Desse modo, ocorre um aumento do tempo de coagulação que é proporcional à atividade da proteína S na amostra. A adição de plasma deficiente assegura que a preparação tem fibrinogénio, Fator V e os outros fatores de coagulação necessários, em quantidade suficiente. A coagulação é iniciada ao nível do factor X pelo ativador do Fator X do veneno. Com a intervenção do fator V ativado remanescente, o Fator X ativado, forma trombina a partir da protrombina. Por fim, a trombina transforma o fibrinogénio em fibrina. O momento da coagulação pode ser detetado de forma mecânica, ótica ou através de outros princípios de medição.

Proteína S livre

A proteína S é uma proteína plasmática dependente da vitamina K sintetizada, sobretudo, pelo fígado. Durante a coagulação sanguínea, a proteína S exibe uma função anticoagulante essencial atuando como cofator da proteína C ativada. Na presença de cálcio, a proteína S forma um complexo com a proteína c ativada, que se liga às superfícies dos fosfolípidos e acelera a inativação proteolítica dos fatores V ativado e VIII ativado.

Princípios do método- as partículas de poliestireno são revestidas com dois anticorpos monoclonais diferentes, ambos específicos para a proteína S livre. O reagente de látex resultante agrega-se quando misturado com amostras que contêm proteína S livre. O grau

de agregação é diretamente proporcional à concentração de proteína S livre na amostra de teste e é detetado turbidimetricamente através do aumento na turvação.

3.4- Siemens *Rapidpoint 500*

O Equipamento Siemens *Rapidpoint500* (figura 13) é utilizado para quantificações de cálcio ionizado e gasometrias (metahemoglobina, carboxihemoglobina), pressão de oxigénio (PO_2), pressão de dióxido de carbono (PCO_2), oxihemoglobina, ácido láctico, hemoglobina h (hBH), glicose, cloro, pH, potássio e sódio e fornece resultados rápidos, abrangentes e precisos, em aproximadamente 60 segundos.



Figura 13-Siemens *Rapid point500*.

Imagem retirada da página <https://www.kwipped.com/rentals/product/siemens-healthineers-rapidpoint-500-blood-gas-analyzer/13620>, acedida a 31 de julho de 2022.

3.5- Sebia capillarys

Este setor dispõe de um equipamento igual ao que está presente no setor de hematologia, em causa o equipamento Sebia capillarys, para a determinação de eletroforese das proteínas. A eletroforese é uma técnica bastante importante, pois permite detetar alterações qualitativas e quantitativas nas proteínas séricas.

A eletroforese de proteínas é uma técnica de separação que utiliza forças eletroforéticas e eletroosmóticas (figura 14) e as frações separadas são visualizadas a partir de um corante sensível a proteínas. Os resultados devem ser sempre expressos sob a forma

percentual e de concentração das diversas frações e em forma gráfica (tabela 3) (figura 15).

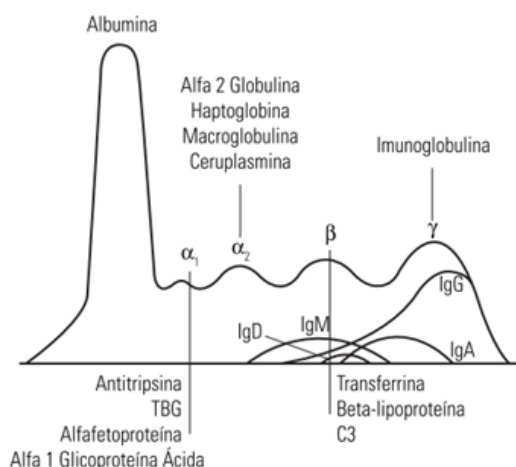


Figura 14- Representação de diferentes proteínas separadas por eletroforese.

Imagem retirada de <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2012/10/eletroforese-de-proteinas-sericas-eps.html> , acessada a 30 de julho de 2022.

Tabela 3- Valor percentual de referência de proteínas pesquisadas em perfil de eletroforese.

Fração	Valores de referência (g/dL)	Percentagem (%)
Albumina	3,75-5,01	52,8-70,6
Globulina alfa 1	0,21-0,35	2,9-3,0
Globulina alfa 2	0,52-0,84	7,3-11,8
Globulina beta	0,62-0,94	8,8-13,3
Globulina gama	0,82-1,34	11,6-18,9
Relação albumina-globulinas: 0,99-1,81		

Valores de referência retirados de relatório analítico

A amostra de soro humano, rica em proteínas, é aplicada sobre um meio composto de acetato de celulose ou gel de agarose e, em seguida, sofre a ação de um potencial elétrico gerado por um polo positivo (ânodo) e outro negativo (cátodo).

Esse potencial provoca a migração das proteínas em direção ao ânodo e, de acordo com o peso molecular e carga elétrica deste, percorrem distâncias distintas, gerando diferentes bandas, representadas por albumina e as globulinas alfa, beta e gama (figura 19).

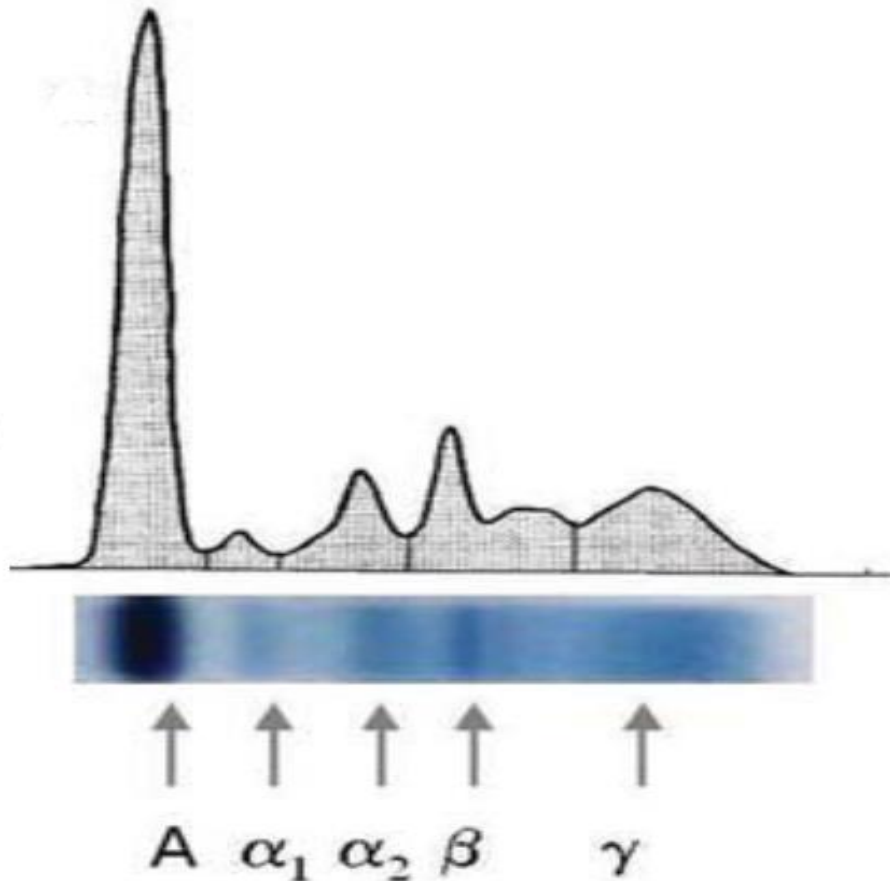


Figura 15- perfil eletroforético normal representado por gráfico e coloração de bandas. Imagem retirada de https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Eletroforese-serica-em-gel-de-agarose-A-Perfil-normal-B-mieloma-multiplo_fig1_250035668 , acedida a 30 de julho de 2022.

As frações são quantificadas por densitometria ou eluição, gerando um gráfico no qual as bandas podem ser comparadas, possibilitando melhor evidência de alguma anormalidade.

4. Setor de Hematologia

A este setor chegam separados tubos de EDTA k3 com análises gerais para determinação de Hemograma, reticulócitos, velocidade de sedimentação (VS) e hemoglobinas A1c, que entram nos equipamentos em cadeia Sysmex XN-10 (figura 16) e tubos de EDTA para estudos de variantes de hemoglobina.

4.1- Cadeia Sysmex XN-10



Este equipamento, corresponde a um analisador de hematologia que realiza uma análise completa da hematopoiese por citometria de fluxo fluorescente, que utiliza um laser semiconductor com focagem hidrodinâmica para:

- contagem de eritrócitos (RBC), leucócitos (WBC) e plaquetas (PLT).
- contagem dos granulócitos imaturos (IG).
- contagem de eritroblastos (NRBC); fração imatura dos reticulócitos (IRF) e hemoglobina nos reticulócitos (RET-He)
- determinação da fração imatura das plaquetas (IPF) e da contagem das plaquetas fluorescentes (PLT-F)

Figura 16-Equipamento Sysmex XN-10.

Imagem retirada da página <https://www.sysmex.com/US/en /products /hematology/xnseries /pages/xn-10-automated-hematology-analyzer-with-blood-bank-mode.aspx>, acedida a 1 de agosto.

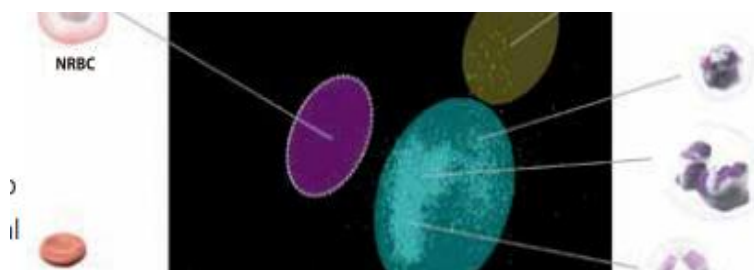
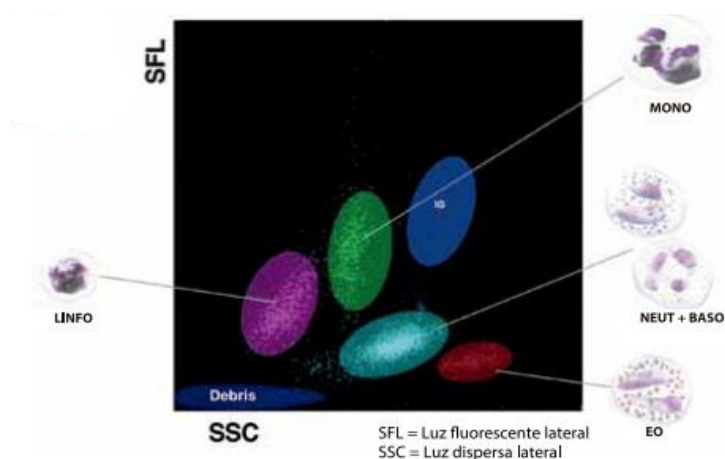


Figura 17- Parâmetros observados no canal WNR: WBC, BASO#, BASO%, NRBC#,NRBC%.

Imagem retirada de <https://www.sysmex.com/la /pt/Products /Documents/XN-Tecnologia-Portugu%C3%AAs.pdf>, acedida a 1 de agosto de 2022.

No canal WNR, o analisador mede a fluorescência lateral e a dispersão frontal de luz. A fluorescência lateral avalia o conteúdo de material nucleico para identificação e quantificação de eritroblastos

e leucócitos. A luz desviada frontalmente mede o tamanho da célula. O corante utilizado é a polimetina, específico para ácidos nucleicos e lise celular e como reagentes utiliza Lysercell WNR e Fluorocell WNR (figura 17).



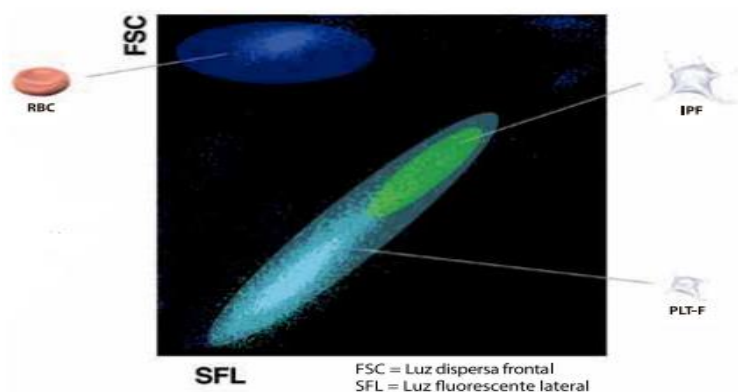
No canal WDF, para analisar granulócitos, utiliza a tecnologia de citometria de fluxo fluorescente e a metodologia SAFLAS e como reagentes utiliza Lysercell® WDF e Fluorocell WD (figura 18).

Figura 18- Parâmetros observados no canal WDF: NEUT%, NEUT#, LINFO%, LINFO#, MONO%, MONO#, EO%, EO# IG%, IG#.

imagem retirada de <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Tecnologia-Portugu%C3%AAs.pdf>, acessada a 1 de agosto de 2022.

A Série-XN utiliza a impedância para a contagem de plaquetas, mas quando a precisão dessa contagem não pode ser garantida por este método, é executada uma contagem de plaquetas utilizando fluorescência.

No novo canal de plaquetas fluorescentes - PLT-F (figura 19) as plaquetas são identificadas e quantificadas pelo corante fluorescente específico, a Oxazina que cora a superfície dos retículos endoplasmáticos rugosos e das mitocôndrias. O parâmetro IPF avalia diretamente a trombopoiese e é utilizado em conjunto com outras informações clínicas disponíveis para diferenciação dos mecanismos fisiopatológicos das causas de trombocitopenia.

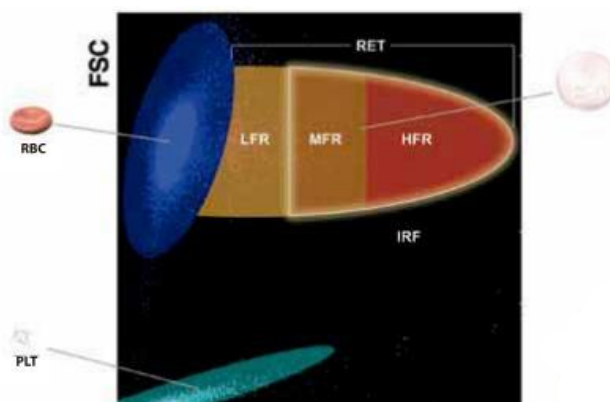


A tecnologia utilizada é a Citometria de fluxo fluorescente com corante específico para plaquetas e como reagentes utiliza CELLPACK DFL e Fluorocell PLT.

Figura 19-Parâmetros reportáveis no canal PLTF: PLT-F - Plaqueta Fluorescente e IPF - Fração Imatura de Plaquetas.

Imagem retirada de de <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Tecnologia-Portugu%C3%AAs.pdf>, acessada a 1 de agosto de 2022.

Os parâmetros reportados no canal de reticulócitos (figura 20) fornecem uma avaliação celular completa da eritropoiese. Os glóbulos vermelhos em circulação no sangue periférico são classificados e diferenciados pelo seu tamanho e estado de maturação. Essas análises fornecem informações quantitativas e qualitativas que permitem uma avaliação celular direta da eritropoiese, útil em casos de anemia e na monitorização das terapias de ferro quando utilizadas em conjunto com outras informações clínicas disponíveis.



A Tecnologia utilizada é de Luz dispersa frontal e fluorescência lateral e os reagentes utilizados são o CELLPACK DFL e Fluorocell RET.

Figura 20-Parâmetros reportáveis no canal RET: RET#, RET%, IRF (Fração Imatura dos Reticulócitos) e RET-He (Conteúdo de Hemoglobina nos Reticulócitos).

Imagem retirada de de <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Documents/XN-Tecnologia-Portugu%C3%AAs.pdf>, acessada a 1 de agosto de 2022.

4.1.1- Hemograma

De uma forma geral, são utilizados métodos de espectrofotometria, impedância, citometria de fluxo, citometria de imagem e microscopia para avaliação de parâmetros de hemograma, fornecidos pelo equipamento, que são os seguintes:

Para Eritrograma:

- hemoglobina
- eritrócitos
- volume globular
- volume globular médio
- hemoglobina globular média
- concentração de hemoglobina globular média
- RDW

Para Leucograma:

- Contagem de leucócitos
- Percentagem de neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos

Para Plaquetas:

- Número
- Volume plaquetário médio

Antes de iniciar a rotina laboratorial, são utilizados 3 controlos de qualidade interna fornecidos pela casa comercial (alto, normal e baixo) para todas as análises realizadas nestes equipamentos. Fazem-se os registos na plataforma laboratorial, *Innovway*, de forma a fornecer as informações sobre as manutenções executadas. No final da rotina faz-se uma lavagem como *Cellclean* Auto e encerra-se a cadeia.

Posteriormente, o CQI é verificado e avaliado nos vários equipamentos da cadeia e no Caresphere (programa informático operacional) onde ficam registados os desvios ocorridos.

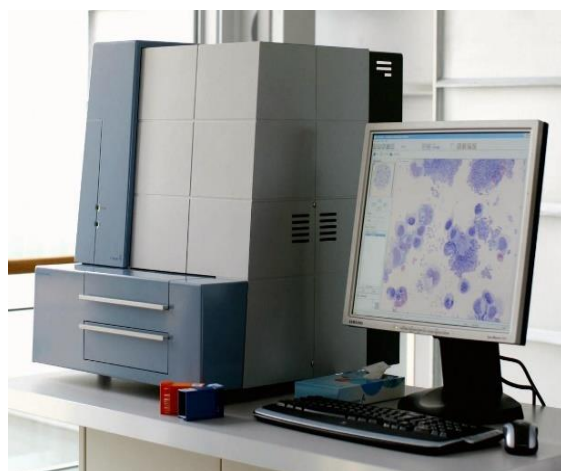
A validação dos resultados da rotina é feita segundo regras de validação, que resulta em hemogramas validados automaticamente, hemogramas validados manualmente e hemogramas em que é feita a observação microscópica do esfregaço sanguíneo, utilizando o equipamento *Cellavision*, um equipamento responsável por evidenciar de forma agrupada e digitalmente, a morfologia das diferentes células sanguíneas.

Os hemogramas são produzidos em um dos três regimes: Rotina, Urgência, *point-of-care*.

- Hemograma de Rotina: cumpre todas as etapas do processo, incluindo revisão do esfregaço sanguíneo se necessário.
- Hemograma de urgência: emissão de hemograma com diferencial automático sem análise do esfregaço sanguíneo, sujeito a ser revisto posteriormente.
- Hemograma de *point-of-care*: hemograma com código analítico específico, realizado na unidade de laboratório local. Presume apenas contagem automática não ter fórmula leucocitária; o relatório sai com ressalva de “realização em regime de *point-of-care*”.

Este equipamento tem um compartimento, o *Sorter*, que organiza os tubos para serem determinadas as VS, hemoglobinas glicadas, e ações pendentes (necessidade de retirar coágulo, necessidade de aquecer, necessidade de homogeneizar), e um compartimento onde ficam organizadas as amostras já determinadas, para colocar no arquivo. As amostras são rejeitadas ao fim de 24h.

Associado a este equipamento, e como já foi referido, está associado outro equipamento, o CellaVision DM 96 (figura 21), que foi projetado para automatizar o esforço manual



demorado associado à microscopia tradicional. É responsável pela coloração em tempo real das lâminas, a partir de resultados duvidosos determinados anteriormente no equipamento XN-10. As imagens obtidas ficam registadas e são comparadas a imagens presentes numa biblioteca, na medida que é possível aceder a imagens e comentários de históricos do paciente de

Figura 21- equipamento CellaVision DM 96.

imagem retirada de <https://www.siemens-healthineers.com/br/hematology/systems/cellavision-dm96-digital-cell-morphology-system> , acedida a 1 de agosto de 2022.

forma a ajudar no diagnóstico. Diariamente é utilizada uma Lâmina para controlo de qualidade, para controlar a coloração e a identificação.

4.2- VS

A velocidade de sedimentação (VS) é uma análise de rotina que consiste em avaliar a sedimentação dos eritrócitos, evidenciando o estado geral de saúde do utente. Permite também avaliar um possível processo inflamatório ou infeccioso.

Para determinar a VS, são utilizados controlos de qualidade da Biorad, um normal e um controlo patológico, diariamente. São utilizados equipamentos Ves-Matic Cube 30 touch (figura 22) e Ves-Matic Cube 30 (figura 23), que demoram cerca de 19 e 30 minutos respetivamente para fazer a leitura.

São realizadas leituras cinéticas de sedimentação e Agregação utilizando o método de Westergren, leituras essas verificadas após saída do resultado e respetiva comparação visual com o tubo, no caso de o valor ser superior a 30 mm/h.

No caso de o resultado da VS ser inferior a 1mm/h, a análise é repetida no mesmo equipamento, mas caso o resultado seja superior a 140mm/h, a determinação é feita noutra equipamento para verificação do valor fornecido.

Na rotina laboratorial, são utilizados vários níveis de CQI (BioRad), que são verificados no *Unity Real Time* e validados automaticamente. No final do dia, os equipamentos são desligados.



Figura 22- Equipamento Ves-Matic Cube 30 touch

Imagem retirada da página https://www.farminpex.com/products/cube_30-touch,
acedida a 1 de agosto.



Figura 23- Equipamento Ves-Matic Cube 30.

Imagem retirada da página <https://www.farminpex.com/products/cube-30-touch>, acedida a 1 de agosto.

- A determinação da velocidade de sedimentação é realizada após realização do Hemograma, se esta análise for pedida.
- As amostras são introduzidas na Cadeia de Hematologia e separadas automaticamente para a determinação da velocidade de sedimentação.
- Tubos de sangue total (EDTA) com volume reduzido são introduzidos diretamente no Vesmatic Cube 30 para a determinação da análise.

4.3- Hemoglobina A1c

O doseamento da hemoglobina glicada (HbA1c) é uma análise muito importante na monitorização dos níveis de glicose em diabéticos. Os eritrócitos são permeáveis à glicose e a hemoglobina no interior incorpora a glicose em excesso, em função da concentração existente no sangue. Com um tempo de semivida de cerca de 120 dias dos eritrócitos, a HbA1c reflete a glicemia média das últimas 8 a 12 semanas, permitindo um controlo dos níveis de açúcar no sangue, úteis para prevenir a progressão da diabetes, sendo uma percentagem considerada normal, a que está abaixo de 6,5%.

O equipamento Trinity Hb9210 Premier (figura 25) consiste num sistema *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) integrado com *software* de controle Affinity, e determina com precisão os resultados de HbA1c. O doseamento de HbA1c através do método de HPLC, é efetuado por leitura das frações obtidas, a 415 e 500 nm, sendo possível obter a fração HbA1c.

O Trinity Hb9210 Premier usa a ligação específica de glicação de afinidade de boronato para detetar todas as espécies de Hb glicadas presentes, assim permite que o resultado

final seja determinado com base em uma fração de área de pico simples de duas espécies de Hb. A interpretação do resultado é extremamente simples, pois há apenas dois picos no cromatograma:

- Pico que representa a glicação (diretamente correlacionado com o resultado da HbA1c),
- Pico que não representa a glicação (que corresponde a todos os outros tipos de hemoglobina) (figura 24).

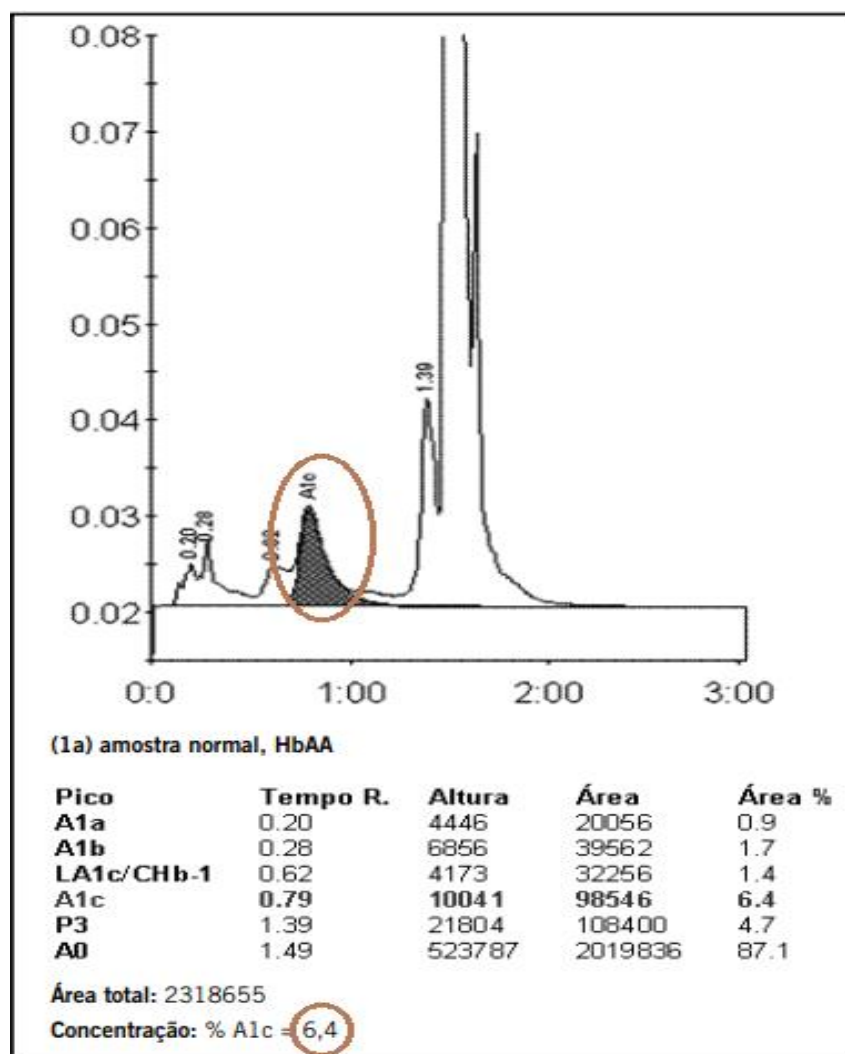


Figura 24 -Resultado da cromatografia para determinação de hemoglobina glicada normal.

Imagem adaptada de https://www.researchgate.net/publication/262745578_HbA1c_determination_by_HPLC_Interference_of_hemoglobin_variants_HbS_HbC_and_HbF_high_concentration/fulltext/039ae5fc0cf21122b71dd888/HbA1c-determination-by-HPLC-Interference-of-hemoglobin-variants-HbS-HbC-and-HbF-high-concentration.pdf, acedida a 30 de julho de 2022.

São utilizados 2 controles (alto e normal) e 2 calibradores diariamente, fornecidos pela casa comercial, e controles Biorad. A cada 50 amostras, o equipamento controla automaticamente, sendo necessário repor todos os consumíveis, quando solicitado pelo equipamento. Os resultados são libertados ao longo do dia após passagens regulares do CQI.

Todas as manutenções feitas ao equipamento, incluindo os controles e calibradores da casa comercial e os controles da Biorad, são registados na plataforma *Innoway*. É feita a verificação e avaliação do CQI no *Unity Real Time*.



Figura 25- Equipamento Trinity hb9210 Premier.

Imagem retirada da página <https://www.trinitybiotech.com/products/premier-hb9210-hba1c-analyzer/>, acedida a 1 de agosto.

- A determinação de Hemoglobina Glicada é realizada após realização do Hemograma e da Velocidade de Sedimentação, se estas análises forem pedidas.
- As amostras são introduzidas na Cadeia de Hematologia e separadas automaticamente para a determinação da Hemoglobina Glicada.

4.4- *Helicobacter pylori*

Neste setor é determinada a presença de bactérias *Helicobacter pylori*, em amostras de sopro, pelo equipamento HeliProbe 1 (figura 26).

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa que existe exclusivamente na mucosa do estômago. Causa gastrite que, por sua vez, pode levar ao aparecimento de úlceras e eventualmente cancro.

A infecção pode ser confirmada com diferentes métodos e testes, em que o teste respiratório de ureia é recomendado por especialistas, por ser um teste não invasivo e mais confiável para diagnosticar uma infecção ativa ou para o acompanhamento da erradicação da infecção.

Este teste respiratório com ureia baseia-se na atividade da enzima urease de *Helicobacter pylori*, após ingestão de uma cápsula Helicap, que se desintegra rapidamente no estômago e a ureia marcada com Carbono 14 alcança a mucosa gástrica. No caso de infecção por *Helicobacter pylori*, o Carbono 14 e ureia são metabolizados em dióxido de carbono e amônia através da enzima urease. O dióxido de carbono é difundido para os vasos sanguíneos, transportado na forma de bicarbonato para os pulmões e libertado como $^{14}\text{CO}_2$ pelo ar expirado. A urease é produzida no estômago apenas por esta bactéria.



É necessário verificar a integridade do teste, nomeadamente se o indicativo passou de cor laranja para a cor amarela e verificar se a membrana está intacta dos dois lados.

A leitura é feita em cerca de 250 segundos, em que a presença ou ausência da bactéria pode ser determinada medindo a presença de $^{14}\text{CO}_2$ no ar expirado.

Uma quantificação inferior a 25U corresponde a um resultado negativo, entre 25-50U resultado indeterminado e uma quantificação superior a 50U, corresponde a um resultado positivo.

Figura 26- Equipamento HeliProbe 1.

Imagem retirada de <https://www.kibion.se/content/uploads/2018/03/Instructions-for-use-Heliprobe-System-PT.pdf>, acedida a 1 de agosto.

4.5- Eletroforese das hemoglobinas

Neste setor também se realiza a Eletroforese das Hemoglobinas, através do equipamento Sebia Capillarys 2 (figura 27). A eletroforese da hemoglobina é uma técnica bem estabelecida utilizada por rotina nos laboratórios de análises clínicas, para pesquisar modificações das hemoglobinas nas amostras.



Figura 27- Equipamento Sebia Capillarys 2.

Imagem retirada da página

<https://www.selectscience.net/products/capillarys-2/?prodID=113321>, acessada a 1 de agosto.

para análise qualitativa ou quantitativa de hemoglobinas. O ensaio é efetuado em glóbulos vermelhos precipitados, centrifugados ou lavados; a lavagem dos glóbulos vermelhos não é essencial para efetuar a análise.

As hemoglobinas humanas normais são constituídas pelas cadeias polipeptídicas α , β , δ e γ :

- hemoglobina A..... = $\alpha_2 \beta_2$
- hemoglobina A2..... = $\alpha_2 \delta_2$
- hemoglobina fetal F..... = $\alpha_2 \gamma_2$

A cadeia α é comum a estas três hemoglobinas. A estrutura espacial da hemoglobina e outras propriedades moleculares (como para todas as outras proteínas) dependem da

A eletroforese permite a separação das hemoglobinas normais (A, F e A2) e a detecção da maioria das variantes de hemoglobina (particularmente a S, C, E ou D), por eletroforese em tampão alcalino (pH 9,4). Este equipamento efetua automaticamente todas as

sequências para obtenção de um perfil de hemoglobina completo

natureza e sequência dos aminoácidos que constituem as cadeias. A substituição dos aminoácidos por mutação é responsável pela formação das variantes das hemoglobinas que têm uma carga superficial diferente e consequentemente mobilidades electroforéticas diferentes, as quais também dependem do pH e da intensidade iónica do tampão.

As hemoglobinas, separadas em capilares de sílica, são direta e especificamente detetadas por absorvência a 415 nm, o qual é específico das hemoglobinas, assim, os perfis eletroforéticos daí resultantes podem ser interpretados visualmente para deteção de qualquer anomalia.

A deteção direta permite efetuar uma quantificação relativa exata, da fração de hemoglobina individual com interesse, tal como a hemoglobina A2 para o diagnóstico da β -talassemia. Adicionalmente, a alta resolução deste procedimento permitirá confirmar a identificação das variantes de hemoglobina, em particular, para diferenciar as hemoglobinas S da D e E da C. Pode também ser efetuada a quantificação de hemoglobina A2 na presença de hemoglobina E.

É preparada uma diluição da amostra com solução hemolisante e injetada, por aspiração, na extremidade anódica do capilar.

A separação da proteína é efetuada aplicando alta voltagem e a deteção direta das hemoglobinas é efectuada a 415 nm, na extremidade catódica do capilar.

Antes de cada análise, os capilares são lavados com solução de Lavagem e preparados para a próxima análise com tampão. Utilizando tampão pH alcalino, são detetadas pela seguinte ordem, do cátodo ao ânodo, hemoglobinas normais e anormais (ou variantes) (figura 28): δA^2 (variante A2), C, A2/o-Arab, e, s, d, G-Filadélfia, F, A, Hope, Bart, J, n-Baltimore e H.

A anidrase carbónica não é visualizada nos perfis electroforéticos da hemoglobina, o que permite a identificação das variantes de hemoglobina A2 nesta zona de migração.

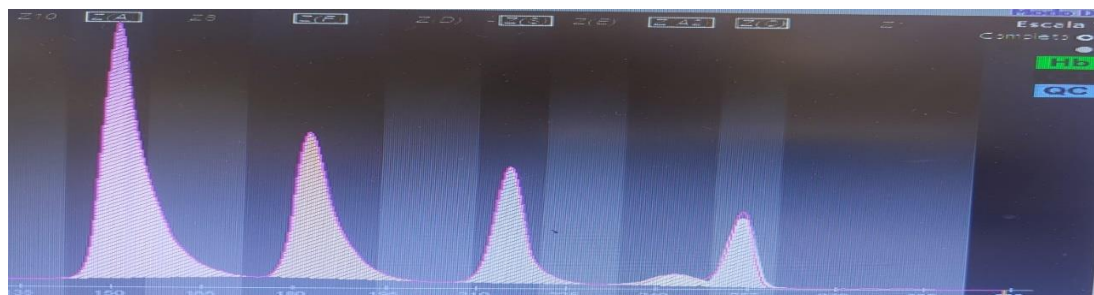


Figura 28 - Gráfico obtido de equipamento Cappylaris 2 representativo das variantes da Hb (HbA, HbF, HbS, HbA2, HbC) de controlo de qualidade de casa comercial.

4.6- Testes rápidos

Para a pesquisa de drogas de abuso na urina, é utilizado um *kit* comercial, que se baseia num método imunocromatográfico. Contrariamente ao que se verifica com restantes testes rápidos, este teste baseia-se no princípio de ligação competitiva – o metabolito caso esteja presente na urina, vai competir com o conjugado droga-proteína por sítios de ligação ao anticorpo presente na zona do teste. A mistura migra numa membrana por ação capilar para reagir com o anticorpo. Na presença de um resultado negativo, os anticorpos monoclonais formam um complexo com o conjugado, observando-se uma linha colorida; assim sendo, a sua ausência, indica um resultado positivo, onde os locais de ligação do anticorpo serão saturados com a droga/metabolito e não se dará a ligação ao conjugado, ou seja, os são positivos caso apresentem apenas uma linha e negativo casos apresentem as duas linhas na tira de teste (figura 29).

É possível a realização de testes rápidos neste setor a:

- Presença de THC
- Presença de Opiáceos
- Presença de Morfina
- Presença de Anfetaminas e Metanfetaminas
- Presença de Cocaína
- Presença de Metadona
- Presença de Benzodiazepinas
- Presença de Barbitúricos
- Presença de Fenciclidina
- Presença de Cutininas
- Pesquisa de Malária
- Pesquisa de *Leptospira*
- Pesquisa de Dengue
- Reação de Paul Bunnell
- Prova falciformação

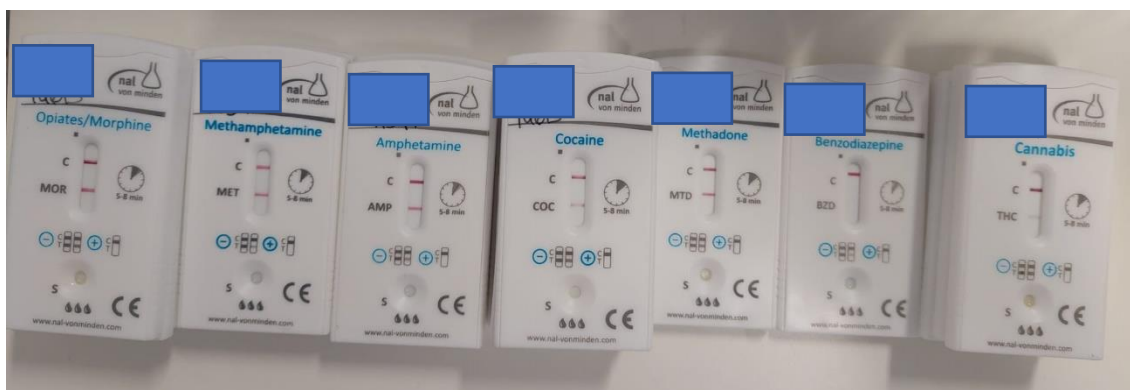


Figura 29- Exemplos de testes rápidos executados no setor de Hematologia.

Resultados de análises relacionadas com drogas de abuso apenas são lançados quando o Termo de Responsabilidade está assinado pelo próprio, quando este tem idade igual ou superior a 16 anos, ou a menores de 16 quando os termos estão assinados pelos pais ou tutores legais. Testes rápidos com resultado positivo ou duvidosos vão para o setor das Análises Especiais para confirmação por outro método. Independentemente do resultado do teste rápido da pesquisa de Benzodiazepinas, a amostra vai para as Análises Especiais pois, no teste rápido só é detetado Oxazepam.

4.6.1. Prova de falciformação

A anemia falciforme é uma doença hereditária caracterizada pela formação de uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S, que resulta na deformação dos eritrócitos, quando são expostos a baixos níveis de oxigênio, assumindo uma forma de foice.

A prova de falciformação, corresponde à pesquisa de células falciformes em lâmina, sob condições de privação de oxigênio.

Execução técnica:

1. Num tubo de ensaio, colocar 200uL de SOLUÇÃO A: Hidrosulfito de sódio (ditionito de sódio: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) a 0,114mol/L (1,985g/100mL) e 300uL de SOLUÇÃO B:

Hidrogenofosfato de sódio (NaH_2PO_4) a 0,114mol/L (1,62g/100mL). A SOLUÇÃO FINAL (C) deverá ter um pH próximo de 6,8 sendo verificado com papel indicador de pH.

2. Para outro tubo de ensaio, pipetar 5 gotas da solução C e uma gota do sangue total (homogeneizado);
3. Numa lâmina transferir uma gota desta mistura e tapar com lamela (preparação a fresco);
4. Estando a montagem pronta, colocar verniz base em volta da lamela para impedir troca de gases com o meio ambiente.
5. Revisão e validação: o Visualizar microscopicamente aos 0 minutos e após 1 hora. o A avaliação é qualitativa e o resultado é reportado como Negativa ou Positiva.

4.7- Espermogramas

Neste setor também se fazem espermogramas, em que amostra tem que respeitar todas as instruções relativas à colheita e transporte do líquido seminal.

Sumariamente esta instrução abordará os seguintes princípios:

- a) A colheita de amostra deve verificar-se após um período de abstinência mínimo de 2 e máximo de 7 dias.
- b) A amostra deve ser colhida no laboratório na sua totalidade, obtida por masturbação direta para o frasco de colheita de abertura suficientemente larga. Pode ser utilizado frasco de vidro ou plástico. Após autorização do sector técnico (e revisão de possíveis condicionantes), poderá ser considerada a entrega acondicionada, sendo mantida entre 20°C e 37°C, e ao abrigo da luz; deve ser registada cuidadosamente a hora de colheita.
- c) Não poderão ser usados preservativos de látex.
- d) Não usar coito interrompido.
- e) A amostra deve ser completa. Na eventualidade de perda de qualquer porção de ejaculado, no ato da colheita ou durante o transporte, a amostra não deverá ser processada para análise.

- f) O frasco contendo a amostra deve ser identificado com o registo numérico do doente, data e hora da colheita.

São avaliadas algumas características tais como:

- Tempo de liquefação
- Viscosidade
- Aparência
- Volume
- pH
- Avaliação microscópica inicial
- Motilidade
- Vitalidade
- Número de espermatozoides
- Morfologia dos espermatozoides

4.8- Validação

Neste setor visualizam-se os valores obtidos do hemograma e lâminas preparadas no cellavision, de resultados com alterações detetadas pelo equipamento Sysmex. Um resultado fora dos intervalos de referência para os diferentes elementos sanguíneos ou a presença de células precursoras automaticamente leva o equipamento a preparar uma lâmina para ser visualizada juntamente com os valores analíticos obtidos no momento da validação.

Previamente é sempre realizado o hemograma, cumprindo todas as etapas do procedimento:

- Em regime de urgência: execução do hemograma e de dois esfregaços sanguíneos
- Pesquisa de formas celulares imaturas, em esfregaço de sangue após coloração;
- Avaliação e descrição das alterações morfológicas observadas.

No setor das validações são verificados os valores obtidos a partir do equipamento Sysmex, observação de separação de diferentes tipos de células pelas suas características e visualizadas as laminas preparadas pelo equipamento Sysmex XN-10, de forma digital (figuras 30,31 e 32) ou manual.

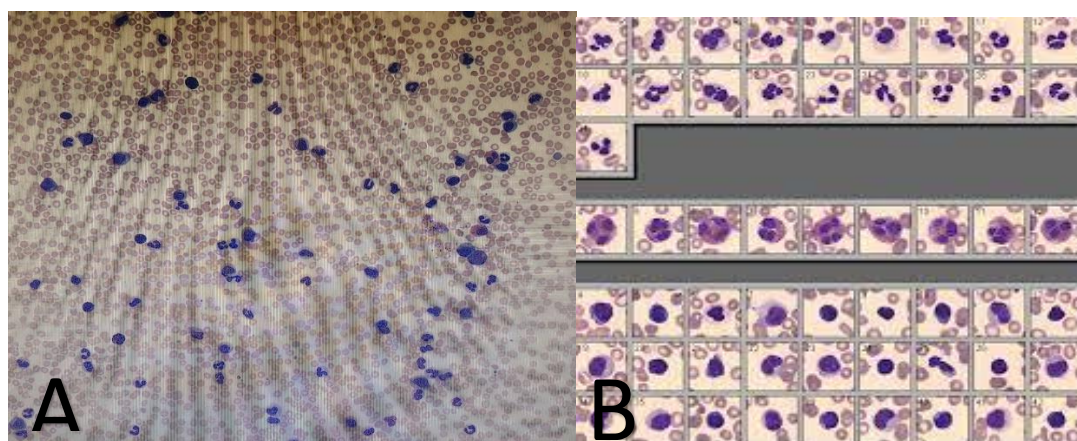


Figura 30- Parâmetros obtidos a partir do equipamento CellaVision. A-exemplo de esfregaço obtido a partir do Cellavision e B- agrupamento de células consoante as características morfológicas sugeridas pelo Cellavision.

Test	Result	C	Unit
Ações médicas			
Ação médica	↓		
Ações técnicas			
Enviar resultados provisórios	↓		
Perfil CBC			
RBC	3 640		10 ¹² /L
HGB	10.2		g/dL
HCT	31.9		%
MCV	87.6		fL
MCH	28.0		pg
MCHC	32.0		g/dL
RDW-CV	18.0		%
RDW-SD	57.4		fL
PLT	479		10 ⁹ /L
MPV	12.8		fL
WBC	107.443	Calculado	10 ⁹ /L

Figura 31- Exemplo de parâmetros de hemograma retidos para validação manual.

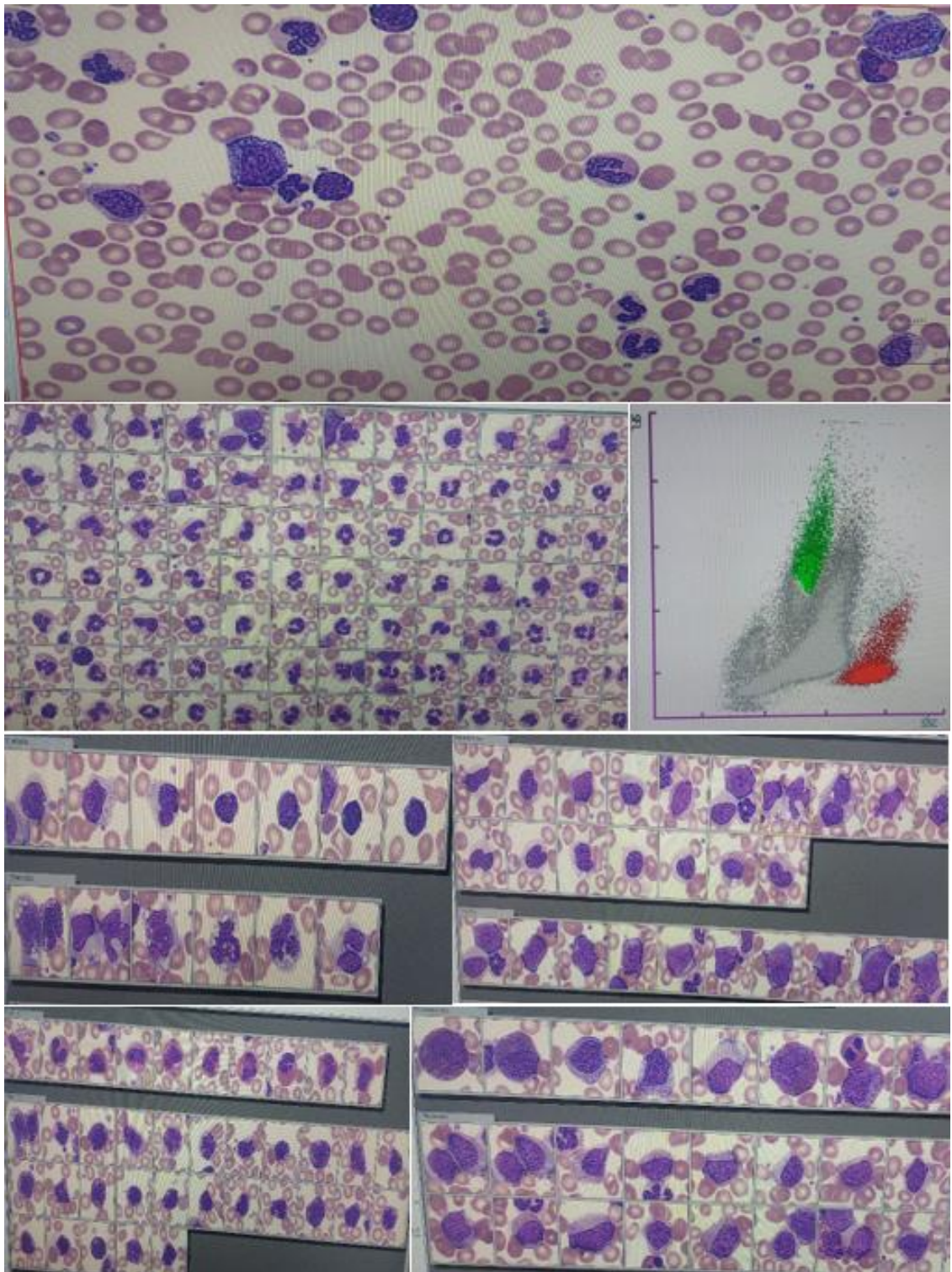


Figura 32- Dados obtidos a partir do equipamento *Cellavison* sugestivos de Leucemia mieloide crônica.

5. Setor de Microbiologia

O setor da microbiologia é um grande setor, com uma forte componente manual e dotada de equipamentos para realização de antibiogramas, identificação de microrganismos (quer por equipamentos, quer por utilização do microscópio ótico) e determinação de urinas tipo II.

Existem também diferentes estufas, com diferentes temperaturas, para o crescimento dos microrganismos, com bastante organização, no que diz respeito à separação dos diferentes tipos de amostras testadas.

Este setor é muito heterogêneo, em relação aos tipos de amostras testadas, tais como: urina, fezes, exsudados vaginais e uretrais, exsudados auriculares, exsudados oftalmológicos, expetoração, unhas, etc.

Este setor está dividido em secções, nomeadamente:

- Setor da determinação de urinas tipo II
- Cultura de amostras
- Identificação e antibiogramas
- Validação

5.1- Setor da determinação de urinas tipo II

A análise da urina do tipo II fornece informações importantes para o diagnóstico, orientação terapêutica e monitorização de doenças do sistema urinário. A sua análise envolve três princípios básicos: exame físico, exame químico e a observação do sedimento urinário.



Amostras de urina tipo II são introduzidas na cadeia sysmex UC-3500 (figura 33), lidas através do código de barras e após homogeneização uma pequena quantidade é pipetada e separada pelos diferentes compartimentos da tira teste Combur. O equipamento Sysmex UC-3500 corresponde a um analisador totalmente automatizado para determinação de parâmetros químicos, que fornece resultados clínicos. A tecnologia utilizada por este equipamento, consiste na utilização de um sensor semiconductor de óxido de metal complementar, que contata com a tira de teste, para distinguir a coloração provocada pela reação tira-urina, utilizando o método de fotometria de refletância e refratometria. Os parâmetros analisados são: cor, aspeto, pH, densidade, presença de proteínas, presença de glicose, presença de corpos cetônicos, presença de hemoglobina, presença de bilirrubina, presença de urobilinogénio e presença de nitritos.

Figura 33- Autoanalisadores de urina série UN.

Imagem retirada da página <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Urinalysis/UN-Series-Urinalysis/Pages/UN-Series-Urinalysis.aspx>, acedida a 20 julho de 2022.

Sendo automatizado, tem como funções: a aspiração da amostra, a comparação de cores e a emissão de resultados. Além dos parâmetros químicos padrão, a tira sysmex faz a determinação de microalbuminúria e creatinina através de cálculo matemático, obtendo a relação albumina /creatinina e proteína/creatinina. Este equipamento está integrado com outros analisadores da gama, neste caso, analisadores sysmex UF-5000 e sysmex UD-10 (figura 33).

Qualquer alteração encontrada nas tiras de amostra analisadas no Sysmex UC-3500, faz com que a amostra analisada seja enviada para o autoanalisador UF-5000 baseado na técnica de citometria de fluxo de fluorescência, que analisa até 17 parâmetros de importância clínica nas amostras de urina (em torno de hemácias, leucócitos, células epiteliais, bactérias, cristais, etc).

O sysmex UD-10 é um instrumento totalmente automatizado de análise de imagens digitais das partículas de urina, que completa a linha de urianálise da Sysmex, cuja validação não

é feita de forma automática, ou seja, as imagens obtidas a partir deste instrumento são agrupadas por categorias e validadas após avaliação de pessoal qualificado.

O exame microscópico do sedimento urinário permite identificar, caracterizar e semiquantificar os elementos figurados clinicamente significativos como eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cristais, cilindros, microrganismos e muco, entre outros achados (figura 34).

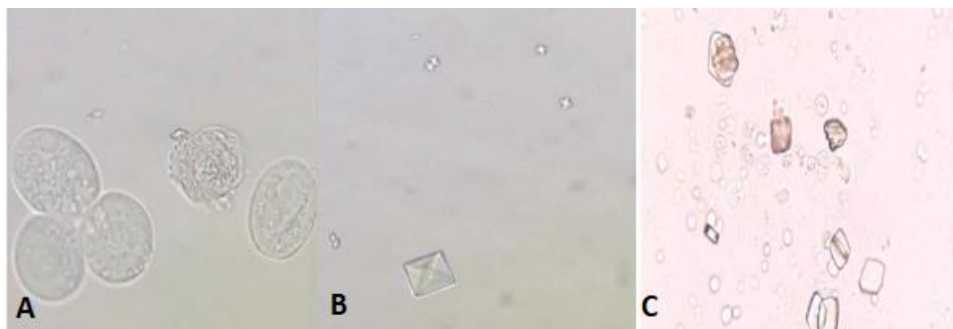


Figura 34- Achados na urina com importância clínica. A) células renais tubulares, B) cristais de oxalato de cálcio, C) cristais de ácido úrico.

Neste departamento, as amostras ficam registradas e são armazenadas por um período de 24h, até verificação e conclusão de procedimentos posteriores. Quando pedido, as amostras são semeadas consoante o meio de cultura mais apropriado. (figura 35)

5.2- Cultura de amostras



Figura 35- Meios utilizados para cultura de amostras.

5.2.1- Amostras de urina

As amostras de urina são semeadas em meio CLED (figura 36), (Agar de cistina lactose deficiente em eletrólitos) que é um meio de cultura para diferenciação utilizado no isolamento de bactérias da urina. Este meio suporta o crescimento de agentes patogênicos e contaminantes urinários, mas evita a proliferação indevida de espécies de *Proteus* spp devido a ausência de eletrólitos.

Após uma incubação de 24h a cerca de 37°C, as amostras são avaliadas e separadas consoante o crescimento que apresentam em: negativas, positivas e polimorfas.

- Amostras sem crescimento são validadas e o relatório segue para o utente.
- Amostras com crescimento é feito um antibiograma e isolada uma pequena amostra de forma a se identificar o microrganismo presente.
- Amostras polimorfas, ou seja, que apresentam mais do que um tipo de microrganismos, são avaliadas tendo em conta o histórico do utente, no que diz respeito a anteriores determinações analíticas e características (ex.: se é diabético, mulher em fase de gestação, etc.), sendo que pode ser necessário um isolamento para posterior avaliação.

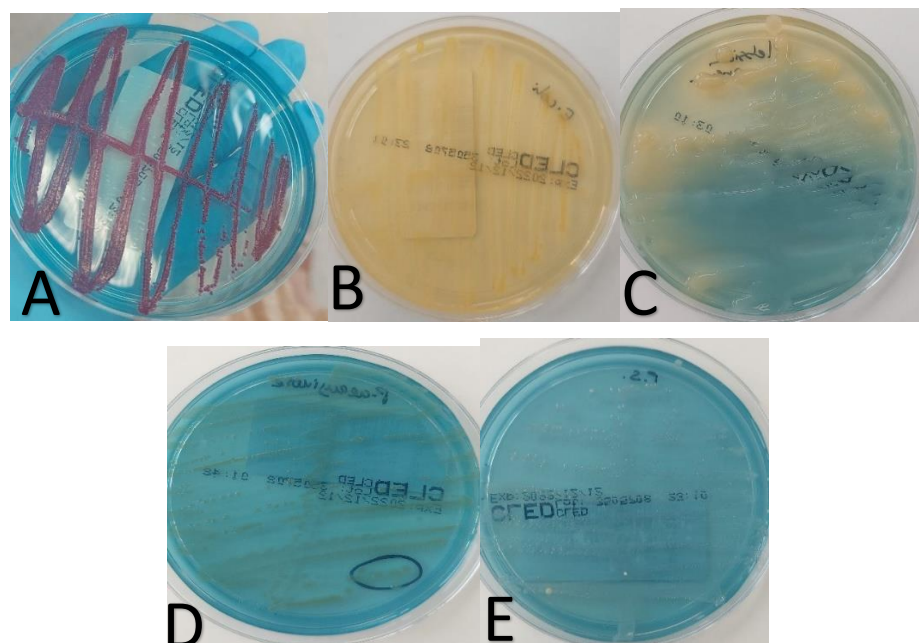


Figura 36- Exemplos de bactérias que podem provocar infeção urinária.

A) *Serratia marcescens*, B) *Escherichia coli*, C) *Klebsiella pneumoniae*, D) *Pseudomonas aeruginosa*, E) *Providencia stuartii*, após identificação em equipamento.

5.2.2- Amostras de fezes (coprocultura)

A detecção dos microrganismos patogénicos nas fezes pode ser de uma tarefa difícil, tendo em conta a presença da microflora fecal abundante e complexa, pelo que a interpretação do exame bacteriológico é importante. A distinção entre microrganismos comensais intestinais e os microrganismos patogénicos, como: *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* enteropatogénica (principais responsáveis por doenças do trato intestinal), é importante de forma a ser executada uma correta validação dos resultados (figuras 37 e 38).

As amostras de fezes são semeadas inicialmente para 3 meios distintos: meio XLD, meio MacConkey e meio Campylobacter, num período de incubação de 48h a 37°C (meio XLD e meio MacConkey) e 48h a 42°C (em condições microaerófilas, para o meio Campylobacter).

- O meio XLD é um meio para diferenciação moderadamente seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de elementos patogénicos entéricos gram-negativos (*Salmonella* spp e *Shigella* spp). É especialmente adequado para o isolamento de espécies de *Shigella*.
- O meio MacConkey é um meio diferencial seletivo utilizado para o isolamento e diferenciação de Enterobacteriaceae e uma variedade de bactérias gram-negativas provenientes de amostras clínicas.
- O meio Campylobacter Agar é um meio seletivo utilizado no isolamento de espécies *Campylobacter*.

Apesar de serem semeadas amostras de fezes nestes 3 meios, é feita também uma sementeira em caldo *rappaport*, que é utilizado para o enriquecimento e isolamento seletivo de *Salmonella* spp. Após uma incubação de 24h a 37°C, é feita uma segunda sementeira em meio XLD, com amostra proveniente durante o mesmo período de tempo e temperatura.

Posteriormente é feita uma avaliação das condições de crescimento/alteração do meio e se se justificar, é feito um isolamento para identificação.



Figura 37- coprocultura negativa.

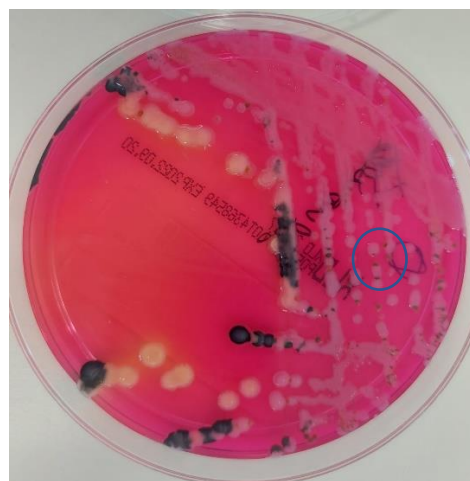


Figura 38- Coprocultura positiva. Após isolamento (círculo), foi detetada *Salmonella* spp

5.2.3-Pesquisa de *Streptococcus agalactiae* (*Streptococcus* do grupo B)

Streptococcus agalactiae é uma bactéria que está presente naturalmente no trato gastrointestinal, urinário e na vagina sem que cause qualquer sintoma. No entanto, em determinadas situações, essa bactéria é capaz de colonizar a vagina, tendo como consequência, complicações durante a gestação e no momento do parto, já que essa bactéria pode ser passada para o bebê durante o trabalho de parto e causar problemas respiratórios, alterações cardíacas ou renais.

Para pesquisa de *Streptococcus* do grupo B, é feita uma sementeira em meio Todd. O meio Todd Hewitt é utilizado principalmente como meio de crescimento de *Streptococcus* betahemolíticos. É feita uma incubação durante 24h a 37°C e posteriormente é semeada uma pequena amostra em meio Strep B, um meio diferencial de *Streptococcus*, utilizado para o isolamento e identificação de *Streptococcus agalactiae* de amostras clínicas.

5.2.4-Exsudado vaginal/ uretral

A flora vaginal é constituída por uma grande variedade de microrganismos, contudo, uma infecção do trato genital, pode ocorrer devido a microrganismos endógenos, cuja patogenicidade foi ativada por fatores do hospedeiro, ou por microrganismos patogênicos adquiridos via sexual. A presença de uma flora polimorfa não deverá ser valorizada, devido à grande variedade de microrganismos presentes no trato genital feminino.

Caso seja visível o crescimento de uma cultura pura de algum dos microrganismos, com um crescimento elevado no meio de cultura, este já deve ser valorizado. Os casos em que se verifica a presença de microrganismos patogénicos também devem ser valorizados.

Perante um exsudado vaginal, é feita uma sementeira para:

- Meio Columbia Agar+Sheep Blood Plus (COLS+)(figura 41), também conhecido por gelose de sangue.
- Meio seletivo para *Neisseria* spp (GCCH) (figura 39).
- Meio *Sabouraud Chloramphenicol Gentamicin Agar* (SABGC) (figura 40), está recomendada para o isolamento de todas as espécies de leveduras e fungos filamentosos. O crescimento dos fungos é promovido pelos nutrientes proporcionados pelas peptonas e pela glicose. A gentamicina e a cloranfenicol inibem o crescimento da maioria das bactérias, como é o caso das Enterobactérias, *Pseudomonas* spp e *Staphilococcus* spp.

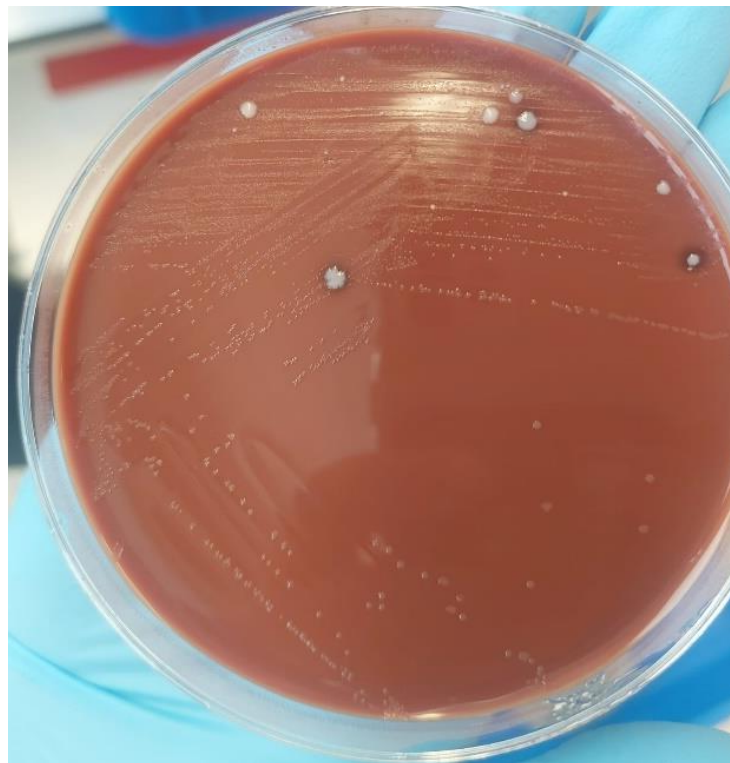


Figura 39- Meio de cultura GCCH com crescimento de *Neisseria* spp



Figura 40- Meio de cultura SABGC com crescimento de *Candida Albicans*

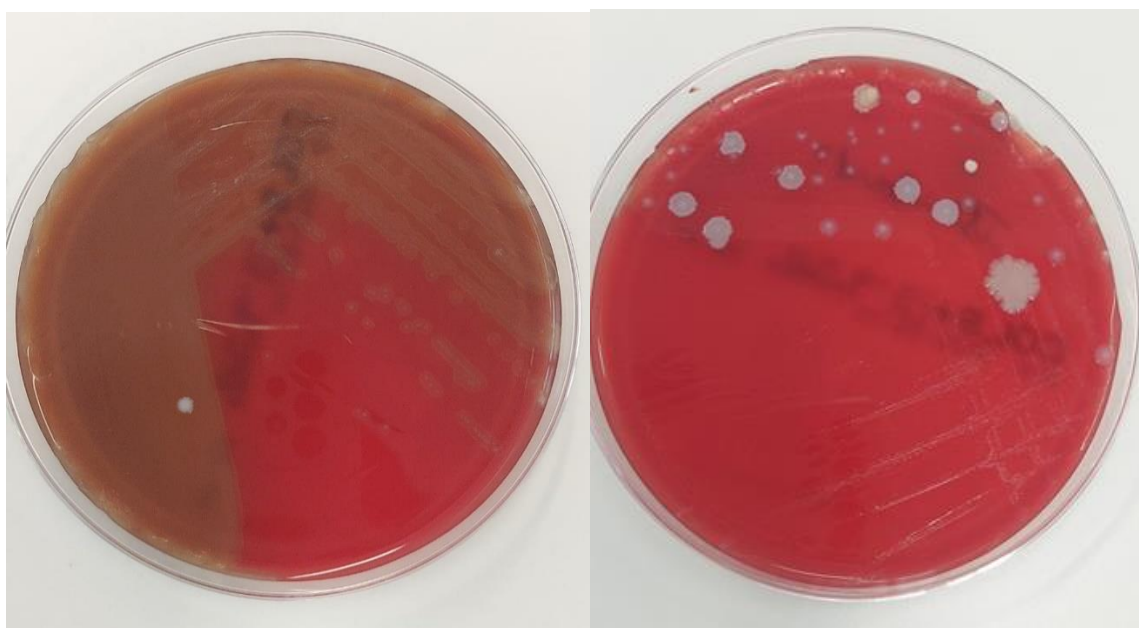


Figura 41- Bacilos doderline e *Gardenerela* spp em meio COLS+

As sementeiras em meio COLS+ (figura 41) e meio GCCH são incubadas a 37°C durante 48h, enquanto as sementeiras em meio SABGC são incubadas a 29°C durante 24h.

São feitas 2 lâminas, para visualização ao microscópio (figura 42), em que uma é corada e outra é guardada por segurança, em caso de danos nas primeiras preparações.

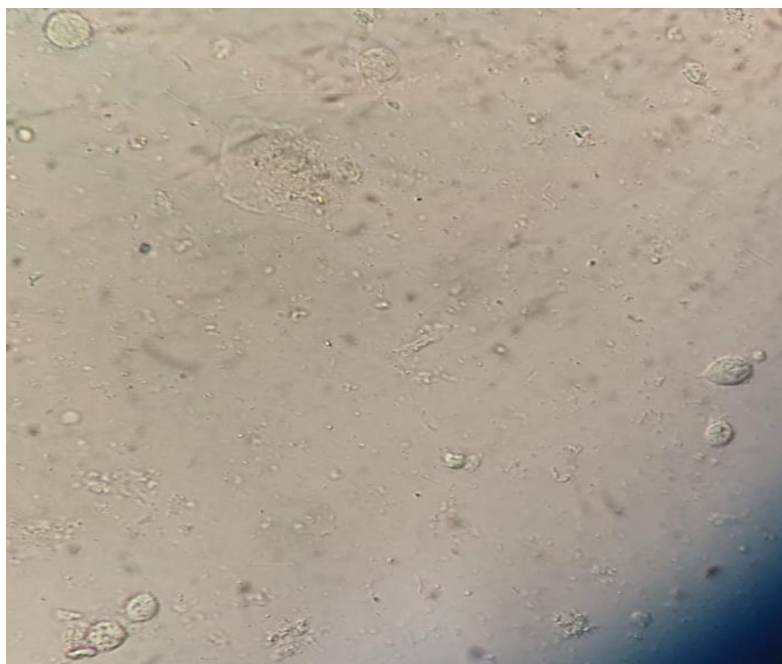


Figura 42- Observação ao microscópio de *Trichomonas vaginalis* com ampliação 400x.

5.2.5-Exsudado auricular

Este produto biológico é utilizado para pesquisar o agente etiológico de uma otite (figuras 43 e 44), em que os agentes mais comuns são *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus Influenzae*.

Para exsudado auricular é feita uma sementeira para:

- Meio CLED
- Meio GCHOC
- Meio COLS+

À semelhança do que acontece com outras amostras, são feitas 2 lâminas em que uma é corada para visualização ao microscópio no momento da validação.



Figura 43- Crescimento de *pseudomonas aeruginosa*

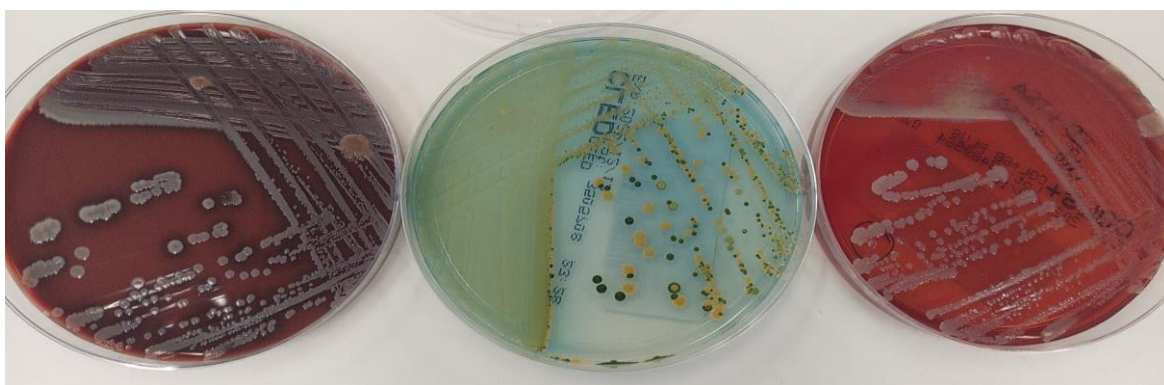


Figura 44- Crescimento de *Staphylococcus aureus*

5.2.6- Exsudados purulentos

Em caso de exsudados purulentos, são feitas sementeiras (figura 45) em:

- Meio COLS+
- Meio de Chapman - Manitol com Cloreto de Sódio, um meio seletivo para o isolamento e a contagem de *Staphylococcus* spp. É também utilizado para a diferenciação entre as espécies fermentadoras de manitol e as espécies não fermentadoras de manitol. A seletividade deste meio baseia-se na presença de cloreto de sódio, o qual inibe o crescimento da maioria das bactérias Gram (+) e Gram (-). A diferenciação dos *Staphylococcus* baseia-se na sua capacidade de fermentação do manitol. A fermentação do manitol induz uma acidificação, a qual torna o meio amarelo na presença de vermelho de fenol (indicador de pH).

- Meio MCK

Se o pus for profundo, é necessário utilizar um caldo de enriquecimento, o caldo de soja triptona, que é um meio de cultura líquido, altamente nutritivo, não seletivo. Posteriormente faz-se uma sementeira em Meio CLED e fazem-se preparações em lâminas para observação ao microscópio.

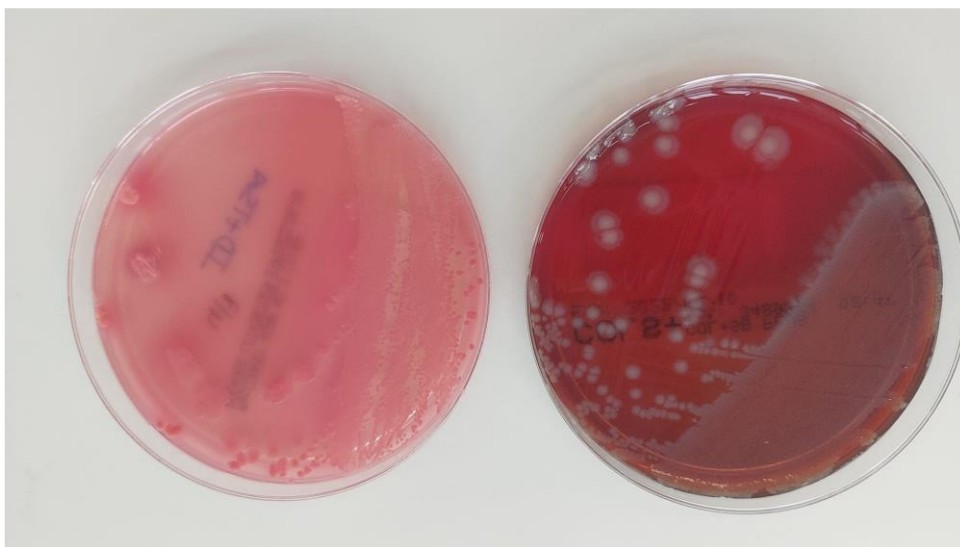


Figura 45- Crescimento de *Escherichia coli*

5.2.7-Expetoração

Uma das principais amostras representativas do trato respiratório inferior é a expetoração, sendo que esta deve ser colhida, preferencialmente, de manhã, para um recipiente estéril. O diagnóstico é, frequentemente, dificultado pela contaminação das amostras por flora comensal da orofaringe durante a colheita, pelo que é bastante importante evitar a sua mistura com a saliva. Os microrganismos mais frequentemente associados a uma infeção do trato respiratório inferior são: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A presença de uma flora polimorfa sem evidente predominância de um dos microrganismos não deve ser valorizada.

Em amostras de expetoração, o exame cultural é realizado usando os seguintes meios:

- Meio MCK
- Meio GCHOC
- Meio COLS+

É feito um exame direto, em que se faz um esfregaço e utiliza-se a coloração Auramina-Rodamina, usando microscopia de fluorescência, para pesquisa de espécies do género *Mycobacterium*, que apresentam uma fluorescência amarelo-avermelhada. Embora a coloração auramina-rodamina não seja específica para organismos álcool ácido resistentes como o *Mycobacterium tuberculosis* ou *Nocardia*, com a coloração de Ziehl-Neelsen, sendo mais sensível, é feita uma repetição utilizando esta técnica.

5.2.8-Pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Para pesquisa de *Staphylococcus aureus* é utilizado um meio de cultura cromogénico seletivo e diferencial destinado ao isolamento e à identificação direta de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA 2).

A presença de uma mistura de antibióticos/antifúngicos e de uma concentração de sal otimizada inibem o crescimento de leveduras e da maioria das bactérias de Gram-negativo e Gram-positivo, com exceção dos *Staphylococcus* resistentes à metilina. A identificação baseia-se na clivagem de um substrato cromogénico através de uma atividade enzimática especificamente produzida para *Staphylococcus aureus*, resultando numa coloração cor-de-rosa das colónias de *Staphylococcus aureus*.

5.2.9-Hemoculturas

A hemocultura é um exame que se baseia na determinação de microrganismos na corrente sanguínea. Com hemocultura positiva, procede-se à cultura, identificação e antibiograma de bactérias aeróbias/anaeróbias e fungos.

As garrafas com hemocultura são colocadas a incubar, cerca de 5 dias e no máximo até 7 dias, a 37°C no equipamento Biomerieux Bact Alert (figura 46), que dá um alarme sempre que houver garrafas de hemoculturas positivas. Os frascos de hemoculturas positivos são removidos dos equipamentos, em seguida, numa câmara de fluxo laminar fazem-se as sementeiras do seguinte modo:



- Do frasco de hemocultura em aerobiose, semear uma gota no meio GCHOC, na estufa de CO_2 a 37°C , num período mínimo de 24h. Posteriormente proceder á identificação no equipamento Maldi Typer e fazer antibiograma de todas as bactérias isoladas.
- Do frasco de hemocultura em anaerobiose efetuar uma subcultura em meio COLS+ e incubar a 48h em atmosfera de anaerobiose. Utilizar discos de antibiótico (penincilina e netilmicina) para facilitar a interpretação. Proceder a identificação no Maldi typer.

Figura 46- Equipamento Biomerieux Bact Alert utilizado em hemoculturas.

Imagem retirada de página <https://www.biomerieux-usa.com/bactalert3d/automatedsystem>, acedida a 1 de julho de 2022.

5.3- Processamento de amostras

A identificação dos microrganismos e os respetivos antibiogramas devem ser efetuados sempre que se encontre um microrganismo possivelmente patogénico nos produtos biológicos em estudo. No caso de crescimento de bactérias ou fungos, considerados valorizáveis para a clínica é sempre feita uma identificação do agente e um antibiograma.

A identificação do agente é feita através do equipamento Maldi Biotyper MBT Smart (figura 47) e os antibiogramas são feitos em equipamentos Walkaway 96 Plus (figura 49).

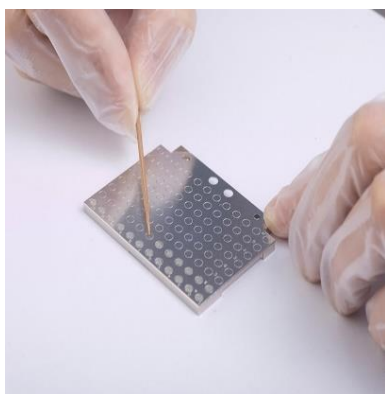
5.3.1- Equipamento Maldi Biotyper



O MALDI Biotyper System identifica microrganismos usando MALDI-TOF -Ionização e dessorção a laser assistida por matriz, uma técnica de ionização utilizada em espectrometria de massa. Proteínas encontradas nos microrganismos compreendem padrões característicos que auxiliam na identificação com precisão, combinando o respetivo padrão com uma extensa biblioteca de referência.

Figura 47- Equipamento Maldi Biotyper Smart para Identificação.

Imagem retirada de página <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/bruker-daltonics-inc/product-75820-667811.html>, acedida a 1 de julho.



Uma pequena quantidade da amostra é transferida do meio e colocada num *target* (figura 48), devidamente identificado, em que cada poço corresponde a uma amostra diferente. É adicionada uma matriz a cada amostra que vai separar as proteínas dos microrganismos. É também colocado num poço um controlo de qualidade, neste caso, o BTS com *E Coli* e a um poço não é adicionada amostra (apenas matriz).

Figura 48- Target utilizado em Maldi Biotyper para identificação.

Imagem retirada de https://www.google.com/search?q=target+maldi+tof&tbm=isch&ved=2ahUKEwiUgqmVian5AhUrxIUkHSzFAFIQ2-cCegQIABAA&og=target+mald&gs_lcp=CgNpbWcQARg_AMgQIlx_AnMgYIA_BAeEAgyBggAEB4QCDIGCAAQHhAIMgYIA_BAeEAgy_BggAE_B4Q_CD_oECAAQQzoFCAAQgAQ6BAgAEB5QIARYzq1g5xtoAHAAeACAAdIBiAGvB5IBBTauNS4xmAE_AoAEBggELZ3dzLXdpei1pbWfAAQE&sclient=img&ei=apfpYpSIFKullwSsioOQBQ&bih=722&biw=1536&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT815PT816#imgrc=2A6zmpGvM7jlqM, acedida a 1 de julho de 2022.

Posteriormente este *target* é colocado no equipamento Maldi Biotyper, e é feita a leitura da amostra em que o resultado indica um *score*, indicativo da precisão da amostra com a previsão do microrganismo presente.

5.3.2- Equipamento Walk away 96 plus



Este equipamento é totalmente automatizado para identificação bacteriana e suscetibilidade antimicrobiana. Neste setor apenas é utilizado para antibiogramas, com capacidade de colocação de 96 painéis, com incubação automatizada, interpretação de testes e controle de reagente.

Figura 49-Equipamento Walkaway 96 para antibiogramas.

Imagem retirada de https://www.google.com/search?q=walkaway+96&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT815PT816&s_xsr=ALiCzsbuBjcsCgK70Lf9skjwy_IFcUxJeQ:1_659474694214_&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjN7qX9iKn5AhWY_4UKHVPU, acedida a 1 de julho de 2022.

Cada painel (figura 50) é utilizado apenas para uma amostra, em que é feita uma adição de uma solução salina, levemente agitada e multi-pipetada de forma uniforme para cada



poço do painel.

Posteriormente os painéis são colocados no equipamento Walk away 96 durante cerca de 24h. Estes painéis podem apresentar turvações, indicativos de crescimento bacteriano. O objetivo será identificar a MIC (concentração mínima inibitória). Estes painéis servirão como ferramenta no momento de validação de resultados.

Figura 60- Painel de antibiograma por micro diluição.

5.3.3- Antibiogramas manuais

No entanto, neste setor podem ser realizados antibiogramas manuais podendo ser utilizados discos de antibióticos para colocar no meio ou tiras E-test. Para além de *Campylobacter* spp, estes antibiogramas manuais podem ser realizados em *Neisseria gonorrhoeae*, entre outros, cujas regras são seguidas através das tabelas da EUCAST.

- Pesquisa de *Campylobacter* spp

Para pesquisa de *Campylobacter* spp é utilizado o meio Campylobacter, caso apresente crescimento ao fim de 48h a 42°C, é feito um antibiograma manual em que são utilizados discos de eritromicina, ciprofloxacina, tetraciclina, amoxicilina com ácido clavulânico e gentamicina. Posteriormente é feita a medição dos halos e feita uma leitura utilizando as tabelas da EUCAST, classificando a bactéria como sensível ou resistente.

- Em *Neisseria gonorrhoeae* são utilizadas 3 tiras Etest para a deteção da resistência antimicrobiana utilizando como antibióticos a ceftriaxona, cefixina e zitromicina.

5.4- Equipamento Biomerieux vitek 2

Apesar dos equipamentos Maldi Biotyper e Walk away 96 plus, este setor dispõe de um outro equipamento com capacidade de identificação e realização de antibiogramas, utilizado apenas em casos excecionais. Este equipamento corresponde ao Biomerieux Vitek 2 (figura 51), utilizado para a realização de antibiogramas para MRSA e *Streptococcus agalactiae*, ou para confirmações pedidas pela equipa de validação, para a distinção entre bactérias *Escherichia coli* e *Shigella* spp.



Figura 51- Equipamento Biomerieux Vitek 2.

Imagem retirada da página [https://www.google.com/search?q=equipamento+Biomerieux + Vitek+2&tbm=isch&ved=2ahUKEwjY4tDkjan5AhUJRhoKHV8QDXMQ2-cCegQIABA_A&og=equipamento+Biomerieux+Vitek+ 2&gs_lcp=CgNpbWcQAzoECCMQJ1CL_HViLH_WC_YIm_gAcAB4AIABZogBxQGS AQMxLjGYAQcQAQGqAQnd3Mtd2l6LWltZ8ABAQ&scient=img&ei=EJjpYtiaKImMad-gtJgH&bih=722&biw=1536&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT8_15PT816#im_grc=Sq_g5_cjg8_bJ4M](https://www.google.com/search?q=equipamento+Biomerieux+Vitek+2&tbm=isch&ved=2ahUKEwjY4tDkjan5AhUJRhoKHV8QDXMQ2-cCegQIABA_A&og=equipamento+Biomerieux+Vitek+2&gs_lcp=CgNpbWcQAzoECCMQJ1CL_HViLH_WC_YIm_gAcAB4AIABZogBxQGS AQMxLjGYAQcQAQGqAQnd3Mtd2l6LWltZ8ABAQ&scient=img&ei=EJjpYtiaKImMad-gtJgH&bih=722&biw=1536&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT8_15PT816#im_grc=Sq_g5_cjg8_bJ4M), acessada a 1 de julho de 2022.

5.5- Equipamentos de coloração de Lâminas

Este setor dispõe também de equipamentos de coloração de lâminas, nomeadamente Aerospray Gram e Aerospray TB.

- O equipamento Aerospray Gram (figura 52), é responsável pela coloração de lâminas de amostras para a identificação de características Gram-Positivas ou Gram-Negativas e utiliza etapas como: coloração com violeta de cristal (um corante solúvel em água, roxo); um processo de descoloração (utilizando etanol / acetona); e uma contra-coloração (utilizando corante Safranina, vermelho).



Figura 52- Equipamento para coloração gram de lâminas.

Imagem retirada de https://www.google.com/search?q=aerospray+gram&tbm=isch&ved=2ahUKEwiPhPrJjgn5AhUJLROKHRsKBskQ2-cCegQIABAA&oeq=aerospray+gram&gs_lcp=CgNpbWcQAziECC_MQJzoFCAAQgAQ6CwgAEIAEELEDEIMBOgg_IABCxAxCDAToICAA_QgAQQsQM6BAgAEBNQ_AhYjihg0CpoAHAAeACAAfUBiAGvDZIBBTguNi4xmAEAoAEBgg_ELZ3dzLXdpei1pbWfAAQE&sclient=img&ei=5ZjpYs_9ClnaaJuUmMgM&bih=722&biw=1536&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT815PT816#imgsrc=fPMHTIEe1Xsu2M, acedida a 1 de julho de 2022.

O equipamento Aerospray TB, é muito semelhante ao equipamento Aerospray Gram, mas tem a particularidade de corar lâminas no caso de suspeita de presença de bactérias álcool ácido-resistentes. Utiliza como corantes a fucsina e auramina-rodamina.

5.6- Testes rápidos

Em certos casos, são feitos testes adicionais para confirmação de presença de espécies:

- Testes rápidos para *Helicobacter pylori*, *Streptococcus pyogenes*, *Salmonella* spp, *Adenovírus*, *Kpc*, *Norovirus*, *Rota adenovírus*, *Astrovirus*, *Rsv*, *Influenza a e b*, *Giardia*, *Strep pneumonia*, *Strep A* e *Legionella* spp.
- Confirmação da presença de *Salmonella* spp, utilizando um anti-soro, com a finalidade de se observar uma aglutinação, caso esteja presente na amostra testada.

5.7- Parasitológicos com concentração

Convém também salientar que amostras de fezes para pesquisa de parasitas, preparadas no setor da triagem, são visualizadas ao microscópio neste setor, com objetiva de 10x ou 40x. É necessário observar e quantificar os elementos celulares (células, leucócitos e eritrócitos) e microrganismos (fungos e parasitas) (figura 53 e 54).



Figura 53-Ovos de *Enterobius vermicularis* com ampliação 100x

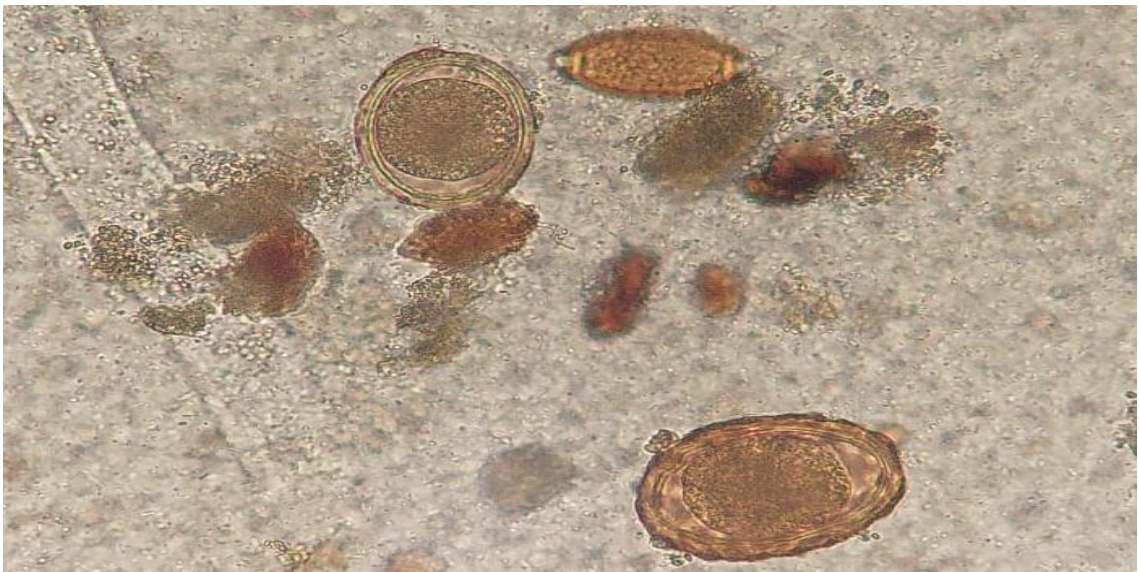


Figura 54- Ovos de *Ascaris lumbricoides* e ovo de *Trichuris trichura* com ampliação 400x

5.8- Validação

Para a validação de resultados é necessário ter em consideração que existem diferentes critérios consoante as amostras:

- Urinas- É necessário verificar o antibiograma e observar se existem ou não discrepâncias. Alguns painéis ficam retidos, ou por motivos técnicos, ou pela necessidade de ter que se executar um outro antibiograma, podem apresentar muita resistência e ser necessário repetição para confirmação dos resultados. São também verificadas as placas de forma a determinar o crescimento bacteriano e verificar se a espécie coincide com a identificação proposta pelo equipamento.

A nível de contagens, crescimentos superiores a 10^5 Unidades Formadoras de Colónias (UFC)/mL devem ser valorizados e crescimentos inferiores poderão ser simplesmente contaminações.

- Fezes- verifica-se se há ou não alguma colónia suspeita que possa ser valorizável clinicamente.
- Exsudados purulentos- visualiza-se o gram (lâminas), para verificar se existem leucócitos. Se existir crescimento bacteriano identifica-se a espécie e faz-se o antibiograma.
- Expetorações- visualizam-se as lâminas: uma corada com auramina-rodamina e lâmina gram. Na lâmina corada com auramina rodamina deteta-se a possível presença de bacilos álcool ácido resistentes. Na lâmina gram verifica-se se a quantidade de leucócitos é superior à quantidade de células epiteliais. No caso de uma cultura pura ou com predomínio de uma determinada bactéria, e presença de leucócitos, o resultado é valorizado clinicamente. No caso de presença polimicrobiana, sem a presença de leucócitos, não se valoriza.
- Pesquisa de *Streptococcus agalactiae*- o resultado é qualitativo, ou seja, positivo se está presente, ou negativo, se está ausente. Verifica-se então a possível presença desta bactéria no meio de crescimento.
- Pesquisa de MRSA- no caso de colónias suspeitas presentes no meio, faz-se a identificação, se corresponder a *Staphylococcus aureus* faz-se o antibiograma e valida-se clinicamente.
- Análises micológicas- visualiza-se o crescimento nas placas e preparam-se lâminas a fresco para visualização ao microscópio.

- Pesquisa de carbapenemases- no caso de se verificar resistência a carbapenemos, faz-se um teste para determinar qual é a enzima responsável pela resistência e valida-se o resultado clinicamente.
- Hemoculturas- Se negativo sai como estéril ao fim de 5 dias. Se positivo verifica-se o Gram, identifica-se a bactéria, realiza-se o antibiograma, e validam-se os resultados.

Diariamente é feito um controlo rigoroso no que diz respeito às análises já concluídas e não concluídas, armazenamento de amostras já efetuadas, cujos tempos de armazenamento variam de amostra para amostra, limpeza de equipamentos e manutenção dos mesmos. São retirados os antibiogramas em fase de conclusão do equipamento e ter em atenção aos “Flags”, uma vez que pode ser necessário uma repetição dos mesmos.

6. Setor das análises especiais

Este setor é talvez o mais complexo da Unilabs, uma vez que compreende todas as análises que não são consideradas como rotina da bioquímica. Este setor dispõem de inúmeros equipamentos, com diferentes finalidades e uma vasta gama de protocolos manuais, e uma vez que, por norma estão disponíveis para análise amostras em pequena quantidade, são necessários bastantes cuidados de manipulação, assim neste setor, o estágio foi considerado como um “estágio de observação”.

O fluxo de trabalho neste setor é calendarizado, ou seja, existem dias específicos para serem feitas determinado tipo de análises.

Este setor, á semelhança do que acontece nos restantes setores, está subdividido em:

- Setor para HPLC- ICP-MS
- Setor de imunoensaio
- Setor de autoimunidade
- Setor de rastreio pré-natal

6.1- Setor para HPLC- ICP-MS

A cromatografia líquida consiste na separação de misturas, no qual as substâncias a serem separadas são distribuídas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), tem sido amplamente utilizada na análise de separação, identificação e quantificação de compostos ativos.

Os principais componentes de um HPLC (figura 55) são:

- Reservatório de fase móvel: Garrafas com solventes utilizados para “transportar” a amostra.
- Injetor: Dispositivo que permite a introdução da amostra no sistema.
- Bomba: Responsável por movimentar a fase móvel e a amostra por todo o sistema.
- Coluna cromatográfica: É um dispositivo preenchido com fase estacionária.
- Detetor: Responsável por identificar os tempos de retenção das substâncias analisadas.

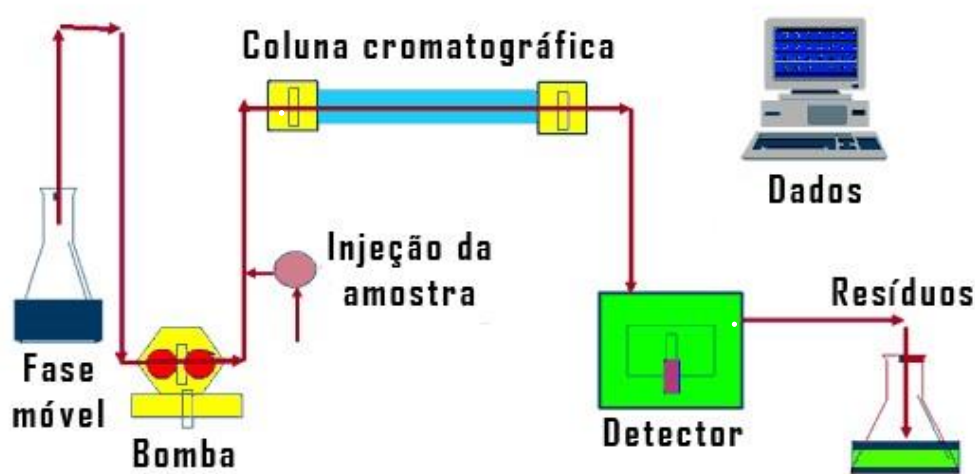


Figura 55- Esquema explicativo de funcionamento de técnica HPLC.

Imagem retirada da página <https://freitag.com.br/blog/o-que-e-a-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia/>, acessada a 20 de julho de 2022.

O tempo de retenção varia de acordo com as interações das substâncias presentes na amostra com as fases estacionária e móvel, por isso, cada composto será eliminado da coluna e identificado pelo detetor num tempo diferente, gerando um pico cromatográfico.

A análise dos diferentes picos permite identificar e quantificar as substâncias presentes na amostra. Existem vários tipos de detetores e a escolha dependerá das características dos compostos de interesse.

Os principais detetores utilizados em cromatografia de fase líquida, são:

- Ultravioleta-Visível (UV-VIS / DAD),
- Fluorescência (FL),
- Índice de Refração (RI),
- Detetor ELSD (*evaporative light scattering detector*) e C.A.D. (*Charged aerosol detector*)
- Espectrometria de Massas (MS).

Um bom detetor de HPLC deve possuir as seguintes características:

- Alta sensibilidade, seletividade, linearidade,
- Ser pouco sensível às variações de temperatura e fluxo,
- Ser preciso e apresentar boa reprodutibilidade.

Neste subsetor existem diferentes equipamentos que utilizam a técnica de HPLC para a determinação de diferentes tipos de análises em diferentes tipos de amostras, em que se faz uma preparação manual consoante a amostra (seguir um protocolo específico) antes de se colocar no equipamento. Como controlos internos utiliza a marca Biorad e RECIP, em que, 4 controlos e 2 calibradores estabilizam de forma a se verificar as calibrações e respetivos cromogramas. É necessário associar a concentração do calibrador a cada um dos picos e depois colocar as amostras.

Equipamento API 5000

O Sistema API 5000™ LC/MS/MS (figura 56) é o espectrómetro de massa triplo quadrupolo mais sensível da atualidade para análise de moléculas pequenas, com baixos limites de deteção, exatidão e precisão para a análise quantitativa.



Análises realizadas neste equipamento:

- Levitiracetam
- Imunossuppressores
(Tracolimus, Cicoplosporina, Sirolimus, Evorolimus)
- Esteroides
- Drogas de abuso

Figura 56- Equipamento API 5000.

Imagem retirada da página <https://www.directindustry.com/pt/prod/ab-sciex/product-61550-593895.html>, acedida a 20 de julho.

Equipamento Waters

À semelhança do equipamento anterior, o equipamento Waters (figura 57) utiliza como princípio a cromatografia líquida aliada a espectrómetro de massa (lc- ms/ms), com ionização por *eletrospray*. A preparação da amostra é feita através de seguimento de protocolo, utilizando o *kit* da casa comercial MANDRAL, e verificar no final a curva de calibração para verificar a concentração.



Análises realizadas neste equipamento:

- Antimicóticos no plasma
- Vitamina A, E e C
- Metanefrinas no plasma
- Imunossuppressores em sangue total

Figura 57- Equipamento Waters Acquity.

Imagem retirada da página https://www.waters.com/webassets/cms/category/media/snapshot/acquity_uplc_hclass_2d_1_1000_bwide.jpg acedida a 20 de julho de 2022.

Gilson

É talvez o equipamento mais antigo neste setor e utiliza o princípio HPLC (figura 58).



Análise realizada neste equipamento:

- Serotonina em sangue total

Figura 58- Equipamento Gilson.

Imagem retirada da página <https://www.artisanTG.com/Scientific/53393-1/Gilson-307-HPLC-Piston-Pump> , acedida a 20 de julho.

Equipamento HTA HPLC 2

Faz-se uma preparação prévia das amostras e equipamento (figura 59) coloca a quantidade de reagentes necessários na execução da análise. São introduzidos 2 calibradores, 4 controlos (2 da Biorad e 2 da casa comercial RECIPI), no fim colocam-se as amostras de urina para análise.



Análises realizadas neste equipamento:

- Metanefrinas
- Ácido vanilmandélico
- Ácido homovanílico
- 5-HIAA (ácido 5 hidroxí indol acético)
- Catecolaminas

Figura 59- Equipamento HTA HPLC 2.

Imagem retirada da página https://www.google.com/search?q=hta+hplc &rlz= 1C 1GCEU pt PTPT956P T956 &source=Inms&tbn=isch&sa=X&ved=2^ hUKE wjpzp3_igr5AhWEjq QKH XI 4AZ4Q AUoAXoECAIQAw&biw=1422&bih=978&dpr=0.9#imgsrc=zOtljK4efNV6rM , acedida a 20 de julh

Shimadzu

O equipamento Shimadzu LC-2030C NT (figura 60), é um sistema integrado de cromatografia líquida de alto desempenho, com desempenho igualmente estável da coluna em muitas injeções contínuas com garantia de resultados confiáveis.



Análises realizadas neste equipamento:

- Caroteno,
- Vitamina B2,
- Ácido hipúrico e metilhipúrico,
- Vitaminas B1 e B6 em sangue total,
- Drogas anti epilépticas,
- Porfirina na urina

Figura 60- Equipamento Shimadzu.

Imagem retirada de https://www.cetec.com.br/produto/hplc-shimadzu-lc-2050-analisador-de-bioetanol_1 . Acedida a 20 de julho.

Neste setor também se realizam técnicas utilizando ICP-MS, Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente, que é um tipo de espectrometria de massa capaz de detetar metais e diversos não-metais em diferentes concentrações.

O equipamento disponível para estas determinações é Plasma Quant MS (figura 61).



Análises realizadas neste equipamento:

- Cádmio, Arsénio, Zinco, Selénio, Alumínio, Mercúrio, Cobre, Magnésio e Crómio.
- Cobre em urina 24h

Figura 61- Equipamento Plasma Quant MS para ICP-MS. Imagem retirada de <https://www.google.com/search?q=plasma+quanto+ms&rlz=1C1GCEUpt-PTPT956PT956&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjP7DbjKr5AhXXuKQKHUx2CQoQAUoAXoECAEQAw&biw=1422&bih=978&dpr=0.9#imgsrc=goLz9juvV60cdM> , acedida a 20 de julho de 2022

6.2- Setor de imunoensaio

Um imunoensaio é um teste bioquímico que mede a presença ou concentração de uma molécula numa solução através de um anticorpo ou um antígeno. A molécula detetada pelo imunoensaio é frequentemente chamada de "analito". Analitos em líquidos biológicos tais como soro ou urina são frequentemente medidos usando-se imunoensaios para propósitos médicos e de pesquisa.

Triturus

É um analisador ELISA totalmente automatizado, executa todos os passos de ensaio ELISA em microplaca, incluindo diluição da amostra, distribuição de reagente, lavagem, leitura e cálculo dos resultados (figura 62).



Figura 62- Equipamento Triturus.

Imagem retirada de <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/grifols/product-68633-637003.html>,
acedida a 21 de julho de 2022

Análises realizadas neste equipamento:

- Imunocomplexos
- Anti Sars-Cov 2 igA
- Teste de libertação interferão gama
- Polissacarídeo capsular pneumocócico IgG
- Elastase pancreática
- Anticorpos anticlamidia tracomatis IgG e IgM
- Anticorpo anti-descarboxilase do ácido glutâmico
- Pesquisa de anticorpos Irregulares
- Toxocara IgG,
- Influenza A e B IgG e IgA
- Tromboxano,
- Anticorpos anti *Helicobacter pylori* IgA e IgG
- Anticorpos anti insulina

Virclia

Neste equipamento, o ensaio é baseado num método indireto quimioluminescente de dois passos onde se obtém resultados quantitativos. A utilização de antígenos de qualidade e de grandes superfícies de revestimento traduz-se numa elevada sensibilidade nos imunoensaios (figura 63).

Neste equipamento ocorrem os seguintes passos:

1. Na primeira incubação os anticorpos presentes na amostra, nos controlos ou nos calibradores ligam-se ao antígeno imobilizado.
2. Na segunda incubação o conjugado éster dimetil de acridina (DMAE) reage com o complexo partículas magnéticas-complexo de anticorpo.
3. Todo o material não ligado é lavado após cada passo de incubação.
4. A quimioluminescência é ativada pela adição das soluções de trigger:
Trigger A (Peróxido de hidrógeno - H_2O_2) Trigger B (Solução alcalina - NaOH)
resultando na oxidação do éster de acridina para um estado excitado.
5. O retorno a um estado normal resulta na emissão de luz, que é medida e expressa em RLU (*Relative Light Units*).

Análises realizadas neste equipamento:

- Anticorpos *Herpes simplex* 1 e 2 IgM e IgG
- Anticorpos anti *Legionella pneumophila* IgM
- Anticorpos anti *Brucella* IgG e IgM
- Anticorpos anti *Chlamydomphila pneumoniae* IgM e IgG
- Anticorpos anti Zika IgG e IgM
- Anticorpos anti *Candida albicans* IgG
- Anticorpos anti Tétano IgG
- Anticorpos anti *Mycoplasma pneumoniae* IgM e IgG
- Anticorpos anti *Bartonella henselae* IgG e IgM
- Anticorpos anti *Leishmania* IgG e IgM
- Anticorpos anti *Troponema pallidum* IgM
- Anticorpos anti Parotidite IgG e IgM
- Anticorpos anti Sarampo IgM e IgG
- Anticorpos anti *Varicela zoster* IgG e IgM
- Anticorpos anti *Adenovirus* IgM e IgG
- Anticorpos anti *Coxiella burnetii* IgM e IgG
- Anticorpos anti *Parvovirus* IgM e IgG

O sinal é diretamente proporcional à concentração dos autoanticorpos específicos presentes nas amostras, calibradores e controlos.



Figura 63- Equipamento Virclia.

Imagem retirada de <https://en.vircell.com/products/VIRCLIA/> , acedida a 21 de julho de 2022

Equipamento BN Prospec

O BN ProSpec System (figura 64) é um analisador totalmente automatizado que utiliza como princípio a imunonefelometria.

O método da imunonefelometria consiste na adição de partículas de poliestireno aderidas a anticorpo murino monoclonal contra o analito, a um determinado soro de um paciente. A ligação entre o antígeno e o anticorpo determina a agregação de tal complexo. Quando um feixe de luz é emitido sobre o complexo formado, há uma reflexão do feixe, proporcional à concentração de analito. Esta reflexão é comparada à reflexão determinada por soro com uma concentração padrão.

Análises realizadas neste equipamento:

- ADNase
- Alfa 1 antitripsina
- Alfa 1 glicoproteína ácida
- Recetor solúvel da transferrina e Transferrina deficiente em carboidratos
- FCC kappa e lambda
- Apolipoproteína a1 e b, E, Apo2
- C4, c5, c1q
- IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4
- Proteína amiloide A
- Alfa 2 macroglobulina
- IgG LCR e urina,
- Pré-albumina,
- Inibidor c1 esterase,
- Plasminogénio
- Cistatina c
- Haptoglobina e ceruloplasmina,
- Cadeias leves totais kappa e lambda
- Albumina LCR
- IgD

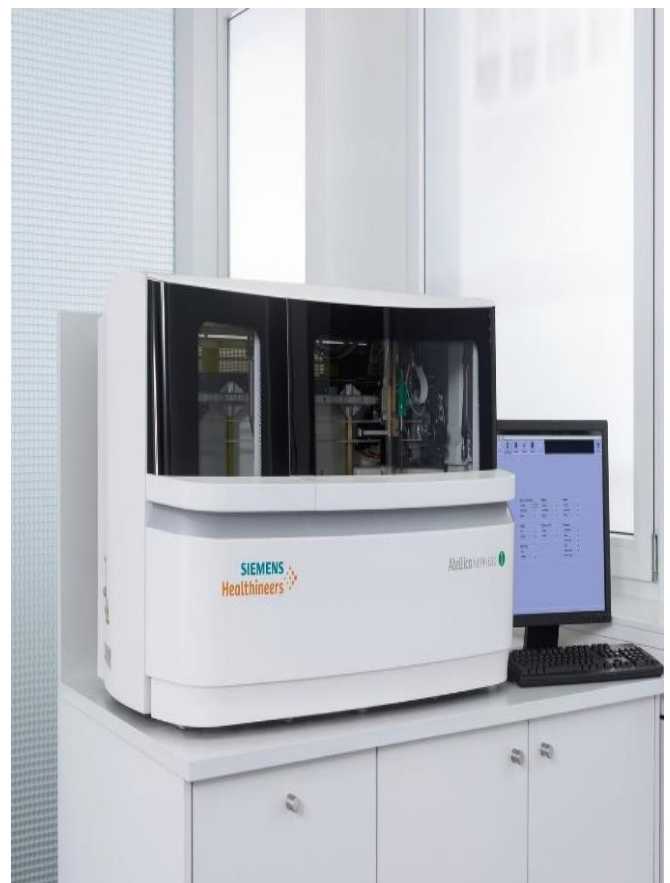


Figura 64- Equipamento BN ProSpec.

Imagem retirada de <https://www.siemens-healthineers.com/pt/plasma-protein/systems/bn-prospec-system>, acedida a 21 de julho de 2022.

Hydrasis

O equipamento HYDRASYS (figura 65) é um analisador para eletroforese em gel. Realiza etapas de eletroforese, desde a aplicação da amostra até a leitura final.

A eletroforese em gel é uma técnica usada para separar fragmentos de DNA de acordo com o seu tamanho. As amostras de DNA são carregadas nos poços (cavidades) localizados numa das extremidades de um gel, e uma corrente elétrica é aplicada para fazê-las migrar. Os fragmentos de DNA estão carregados negativamente, então movem-se na direção do eletrodo positivo. Já que todos os fragmentos de DNA têm a mesma quantidade de carga por massa, os fragmentos menores atravessam o gel mais rapidamente do que os maiores. Quando um gel é pigmentado com um corante que se liga ao DNA, os fragmentos de DNA podem ser vistos como bandas, cada uma representando um grupo de fragmentos de DNA de mesmo tamanho.



Análises realizadas neste equipamento:

- Desidrogenase láctica- isoenzimas
- Detecção de proteínas monoclonais no soro ou urina por imunofixação
- Preparação de fluido cérebroespinal

Figura 65- Equipamento Hydrasis.

Imagem retirada de <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/sebia/product-69959-442598.html>,
accedida a 21 de julho.

Equipamento IDS-Isys

Este equipamento utiliza a técnica de Quimioluminescência Direta (CLIA), que permite um alto grau de precisão dos resultados e a automação de ensaios especializados sem comprometer a integridade dos resultados (figura 66).



Análises realizadas neste equipamento:

- Vitamina D 1.25
- Renina
- Aldosterona
- 17OH- progesterona
- Testosterona livre
- Aldosterona urinária
- Renina direta

Figura 66-Equipamento IDS-Isys.

Imagem retirada da página https://www.google.com/search?q=ids+isys&rlz=1C1NDCM_pt-PTPT815PT816&sxsrf=ALiCzsYMq6vHiktD8AVUR9mcYoFM4H23WA:1659554111724&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwjtcHqsKv5AhUUNxoKHeGvAdAQ_AUoAXoECAIQAw&biw=1536&bih=722&dpr=1.25#imgsrc=k0njSIZVubJO5M, acedida a 21 de julho de 2022.

Equipamento ImunoCAP 1000

Este equipamento é indicado para auxiliar no diagnóstico de doenças alérgicas, utilizando a técnica de imunoensaio de fluorescência (figura 67).



Análises realizadas neste equipamento:

- Phadiatop e Phadiatop infantil
- Triptase,
- IgE específica,

Figura 67- Equipamento ImunoCAP 1000.

Imagem retirada de <https://www.thermofisher.com/phadia/pt/en/our-solutions/phadia-laboratory-systems.html> , acedida a 21 de julho de 2022.

Equipamento Vidas 3

Este equipamento utiliza como técnica ELFA (análise fluorescência de ligação enzimática) (figura 68).



Análise realizada neste equipamento:

- Sars Cov 2 IgM

Figura 68- Equipamento Vidas 3.

Imagem retirada de <https://www.biomerieux-usa.com/vidas-3> , acedida a 21 de julho.

6.3- Setor de autoimunidade e rastreio

Equipamento EuroBlotOne

Este equipamento é responsável pela determinação qualitativa de anticorpos humanos, para processamento completo de *immunoblots*. O sistema realiza a identificação e diluição das amostras e etapas de incubação e lavagem. As tiras incubadas são então automaticamente secas, fotografadas e avaliadas usando o *software EUROLinScan* (figura 69).



Análises realizadas neste equipamento:

- Despiste de IgG para alimentos
- Gangliosídeos IgG e IgM
- Pesquisa de miopatias
- Pesquisa de anticorpos para doenças auto imunes no fígado
- *Equinococcus* spp
- Pesquisa de anticorpos no diagnóstico de síndromes paraneoplásicas
- Anticorpos contra antígenos nucleares citoplasmáticos e mitocondriais

Figura 69- Equipamento EuroBlotOne.

Imagem retirada de <https://www.euroimmun.co.jp/en/automation/immunoblot/euroblotone/> ,
accedida a 22 de julho de 2022.

Equipamento ImunoCAP 250



Figura 70- Equipamento ImunoCAP 250.

Imagem retirada de <http://diagnocel.Com.br/diagnostico-in-vitro/immunocap-250/> ,
accedida a 22 de julho.

Análises realizadas neste equipamento:

(Figura 70)

- Anticorpos ENA
- Anti-TSH
- Calprotectina
- Gliadina
- Peptídeo citrulinado cíclico
- Célula parietal
- Fator intrínseco
- IgG4
- Anticorpos ANA, ANCA, ASCA
- IgM

Byosystems Ipro

Este equipamento executa uma determinação qualitativa de anticorpos (figura 71).



Análises realizadas neste equipamento:

- anticorpos anti-hepiderme
- queratina anticortex adrenal

Figura 71- Equipamento Byosystems Ipro.

Imagem retirada da página https://www.google.com/search?q=biosystems+ipro&tbm=isch&ved=2ahUKEwj2k6P0r6v5AhVlyYUKHRXsDj8Q2cCegQIABAA&ogq=biosystems+ipro&gs_lcp=CgNpbWcQAzIECAAQGD0ECCMQJzoFCAAQgAQ6CwgAEIAEELEDEIMBOggIABCABBCxAzoECAAQAzoECAAQQzoECAAQHjoECAAQE1ChD1jKQGDEQ2gAcAB4AIABnQKIAykUkgEGMC4xMy4zmAEAoAEBggELZ3dzLXdpei1pbWfAAQE&sclient=img&ei=MfqYva3A8iSlwSV2Lv4Aw&bih=978&biw=1422&rlz=1C1GCEU_pt-PTPT956PT956#imgsrc=6HRpV-ZUFLxyyM, acedida a 21 de julho de 2022.

Equipamento Zenit ra

Utiliza o método imunológico quimioluminescente quantitativo (figura 72).



Análise realizada neste equipamento:

- dsDNA IgG

Figura 72- Equipamento Zenit ra.

Imagem retirada de <https://www.menarinidiag.pt/pt-pt/home/produtos-para-laborat%C3%B3rio/autoimunidade/zenit-r>, acedida a 22 de julho

Zenit up – pro

Este equipamento utiliza o método de fluorescência indireta com detecção semi-quantitativa. A imunofluorescência indireta é aplicada a estudos de anticorpos circulantes e utiliza como substrato o epitélio normal (figura 73).



Análises realizadas neste equipamento:

- Anticorpos anti mitocôndria
- Anticorpos anti musculo liso
- Microsomas do fígado e rim
- Anticorpo anti células parietais do estômago
- Eosin-5-maleimida eosina
- IgG e IgA
- Anticorpos antinucleares
- Anticorpos anti DNA

Figura 73- Equipamento Zenit up- Pro.

Imagem retirada de <https://www.medicalexpo.com/pt/prod/menarini-diagnostics/product-79119-508002.html>, a 22 de julho de 2022.

6.4- Setor de rastreio pré-natal

Equipamento kryptor

Utiliza um ensaio imunofluorescente automatizado, que possibilita a visualização de antígenos nos tecidos ou em suspensões celulares, por meio da utilização de anticorpos específicos, marcados com fluorocromo, capazes de absorverem a luz ultravioleta (UV), emitindo-a num determinado comprimento de onda, permitindo sua observação ao microscópio de fluorescência (com luz UV) (figura 74).



Análises realizadas neste equipamento:

- Cromogranina A
- PaPP-a (proteína plasmática A associada à gravidez)
- Beta HCG livre
- Alfa-fetoproteína

Figura 74- Equipamento Kryptor.

Imagem retirada de <https://www.brahms.de/en-gb/products/kryptor-analyzers.html> , acedida a 22 de julho

6.5- Técnicas manuais

Nas técnicas manuais, cada técnica executada é a partir de protocolos específicos, em que apenas algumas das análises, passam pelo espectrómetro para serem lidas as absorbâncias. Neste caso, as análises são: oxalato na urina, ácido cítrico, ácidos biliares, xilose, lisozima, glicose 6 fosfato, ácido delta aminolevulínico (ALA) em urina 24h e porfobilinogenio (PBG) em urina 24h.

As restantes análises como: VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*- objetivo é diagnosticar e monitorar a resposta ao tratamento para sífilis) quimotripsina, fasciola hepática, TPHA (*Treponema pallidum hemagglutination assay* ou *FTA-ABS - Fluorescent Treponemal Antibody Absorption*), cálculos biliares, cistina e fragilidade osmótica, são executadas totalmente com técnicas manuais.

7. Setor da Imunohematoterapia

Este setor é também designado como setor da medicina transfusional.

Está responsável pelas determinações de rotina em tubos de EDTA k3 de análises como Coombs direta e indireta e grupos sanguíneos. A única análise determinada neste setor,

que é exceção, uma vez que não é colhida em tubo de EDTA é a crioglobulina, cuja colheita é efetuada em tubo de soro com gel separador.

Para além das análises de rotina já mencionadas, este setor está responsável pela preparação de unidades para transfusões, na medida, em que se faz o estudo da compatibilidade entre dador e recetor.

O equipamento utilizado neste setor é o Ortho AutoVue System, (figura 75) um sistema totalmente automatizado e qualificado para utilização com todo o menu de cassetes BioVue (figura 76) e “Kit de células” (figura 77), que atendem a todas as necessidades de testes de imunohematologia.



Figura 75- Equipamento Ortho AutoVue System disponível no setor de imunohematoterapia para a determinação de grupos sanguíneos, Coombs direta e indireta e estudo de compatibilidade transfusional.

Imagem retirada da página <https://www.labmakelaar.eu/shop/all/saleable/hematology/ortho-autovue-innova-system/>, acedida a 24 de julho.



Figura 76- Cassetes/cards utilizadas no equipamento OrthoVue



Figura 77- “kits de Células” utilizados no equipamento Ortho AutoVue.

Imagem retirada de <https://www.orthoclinicaldiagnostics.com/pt-br/home/ortho-transfusion-medicine-reagents> , acedida a 24 de julho.

Diariamente são realizadas as manutenções, seguindo o protocolo estabelecido pela casa comercial. Verifica-se a necessidade de consumíveis como: cassetes, água destilada, soro fisiológico, contentor de resíduos, células (A1, B; 1,2,3; Bliss). Posteriormente registam-se as manutenções efetuadas no programa de qualidade.

É realizado o controlo de qualidade, que utiliza 4 níveis definidos pela casa comercial.

7.1- Coombs

O teste de Coombs consiste na pesquisa de anticorpos anti-eritrocitários responsáveis por hemólises de origem imunológica. A prova de Coombs direta tem como objetivo a deteção dos anticorpos fixados, in vivo, nas membranas das hemácias do utente, sendo utilizado para a deteção de reações transfusionais, anemias hemolíticas autoimunes e anemias hemolíticas induzidas por fármacos. A prova de Coombs indireta tem como objetivo a pesquisa de anticorpos não aglutinantes circulantes, através da sensibilização com suspensões de células de antigenicidade conhecida, onde ocorre fixação in vitro. Esta prova é utilizada para a pesquisa e identificação de anticorpos anti-eritrocitários no sangue e provas de compatibilidade.

Os aloanticorpos eritrocitários, chamados anticorpos irregulares, reagem apenas com antígenos eritrocitários de indivíduos que não o próprio. A imunização a antígenos eritrocitários resulta normalmente de transfusão ou gravidez. Um aloanticorpo é considerado clinicamente significativo se encurta a sobrevivência dos eritrócitos transfundidos ou se está associado a doença hemolítica do recém-nascido. Laboratorialmente os

aloanticorpos clinicamente significativos reagem a 37 °C e/ou pela prova de antiglobulina humana.

O despiste da presença de aloanticorpos, utiliza-se para prevenir reações transfusionais imediatas ou retardadas com destruição dos eritrócitos transfundidos e na doença hemolítica do recém-nascido.

A pesquisa de anticorpos irregulares é realizada com plasma ou soro da amostra a estudar e com um painel eritrocitário comercial de três eritrócitos diferentes de fenótipo conhecido. Todas as pesquisas de anticorpos irregulares com resultado positivo obrigam à identificação do anticorpo em causa.

- **Técnica em cartão Poliespecífico Anti- IgG; C3d – Ortho**

A execução manual desta técnica é a mesma executada no Sistema AutoVue, usando os mesmos reagentes.

Como material utiliza: tubos de vidro, pipetas de Pasteur, pipetas automáticas e respectivas pontas, soro fisiológico, incubadora a 37 °C, luvas, centrifuga de cartões da Ortho, suportes para tubos e cartões.

Como Reagentes utiliza:

- Cartões da Ortho Poliespecíficos IgG; C3d armazenados à temperatura ambiente.
- Painel de 3 eritrócitos diferentes com fenótipo conhecido suspensos em soro fisiológico a 0,8 % surgiscreen.
- Painel de 11 eritrócitos diferentes a 0,8% Resolve Painel A, para identificação de Anticorpos Irregulares. Estas “células” compreendem antigénios, que irão reagir com anticorpos, caso estejam presentes no plasma do paciente.

Por norma, a Colheita é efetuada em tubo com EDTA K3 ou tubo seco, posteriormente centrifugada à temperatura ambiente, a 3500 rpm durante 5 min.

Posteriormente, procede-se à execução da técnica:

1. Colocar os reagentes à temperatura ambiente,
2. Identificar o cartão com o nº da amostra,
3. Numerar os microtubos,
4. Retirar a película protetora,

5. Pipetar 50 µL da suspensão de eritrócitos comerciais para cada um dos microtubos respectivos,
6. Pipetar 40 µL de soro a estudar para cada um dos microtubos,
7. Incubar o cartão 10 minutos a 37 °C na incubadora Ortho,
8. Centrifugar durante 5 minutos na centrífuga Ortho,
9. Ler a aglutinação e/ou hemólise em ambas as faces do cartão,
10. Registrar os resultados.

Posteriormente faz-se a interpretação dos resultados, respeitando os seguintes critérios:

Interpretação dos resultados positivos

- Aglutinados à superfície das microesferas ou ao longo da microcoluna com Botão celular compacto à superfície das microesferas e que não a atravessam, pontuação **4+**,
- Botão celular compacto à superfície das microesferas e alguns aglutinados dispersos no terço superior, pontuação **3+**,
- Pequenos aglutinados ao longo das microesferas, pontuação **2+**,
- Pequenos aglutinados no terço inferior do microtubo, pontuação **1+**.

A leitura é registrada num documento modelo (figura 78), colocando então a possível pontuação e procede-se à comparação com os padrões já definidos. Sendo um resultado positivo, posteriormente é determinada a titulação.

INVITROCYTE Scan I-II																				Apresentação							
Hemácias-Teste a 3,0% para Pesquisa de Anticorpos Irregulares																				2 x 10 ml							
																				COD.							
																				IH 002.20-2							
Hemácia N°	Fenótipo Rh	Rh						Kell				Duffy		Kidd		Lewis		MNS				P	Lutheran	Di.	Resultados		
		D	C	E	c	e	C ^W	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Fy ^a	Fy ^b	Jk ^a	Jk ^b	Le ^a	Le ^b	M	N	S	s	P ₁	Lu ^a	Lu ^b	Di ^a		
I	R ₁ R ₂	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+		
II	R ₂ R ₂	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0		
Paciente																											

+ = positivo
 0 = negativo
 NT = não testado
 W = fraco
 S = forte

Colunas sombreadas representam os antígenos que são destruídos ou enfraquecidos pelo tratamento enzimático.

Nome:	Data Nascimento:	Data da coleta:
Resultado:	Data do teste:	Assinatura:

 Conservar em 2-8 °C	 Scan Diagnóstica Ltda – Av J.C. Silveira, 2100 Belo Horizonte – MG – Brasil	IVD Diagnóstico In Vitro	LOT B160417	 22-05-2016
---	--	----------------------------	---------------	--

SCAN DIAGNOSTICA INDUSTRIA E COMERCIO LTDA - IMUNOSCAN

Figura 78- Documento para preenchimento e interpretação de identificação de anticorpos anti regulares

Para a titulação, adiciona-se 100 uL de soro fisiológico em tubos de plásticos devidamente identificados já com o fator de diluição. Adicionar ao primeiro tubo 100uL de plasma e transferir consecutivamente 100uL para o próximo, depois de vortexar a amostra e descartar as pontas da pipeta. Na cassete Poly, é adicionada cerca de 50uL de uma das 3 células, cuja reação foi mais forte e adiciona-se também 40uL de cada diluição preparada a cada um dos poços da cassete. Posteriormente vai incubar e centrifugar para fazer a leitura.

Resultado Negativo – Eritrócitos livres formando um botão compacto no fundo do microtubo.

A presença de um resultado positivo em alguma ou mais células, implica a identificação dos anticorpos presentes e compatibilização de unidades negativas para o antígeno correspondente ao anticorpo.

7.2- Grupos

Os antígenos (Ag) ABO estão presentes nos eritrócitos e em outras células do organismo. Três alelos comuns A, B e O estão localizados no locus ABO no cromossoma 9. Os genes A e B codificam glicotransferases que dão origem à substância A e B respetivamente. O gene O é considerado não funcionante porque codifica um produto proteico não detetável como antígeno de grupo sanguíneo.

No sistema ABO, sempre que um determinado Ag não está presente é esperada a presença do anticorpo (atc) correspondente. Em recém-nascidos e até aos 4-6 meses de idade, a pesquisa no soro de Anti-A e anti-B, não pode ser considerada válida, porque a totalidade destes anticorpos ou a sua maioria são de origem materna, com passagem através da placenta. Nos idosos, por défice de Imunoglobulinas, poderá a prova sérica não dar resultados conclusivos.

Então o fenótipo ABO, exceto nos recém-nascidos, é definido por Ag eritrocitários e por anticorpos séricos. Em testes de rotina, utilizando reagentes com anticorpo conhecido, é possível detetar 4 fenótipos: Grupo A, Grupo B, Grupo AB e Grupo O, de acordo com a presença de Ag A, B, A e B ou nenhum respetivamente.

A determinação do grupo sanguíneo, pelo sistema ABO, é bastante importante, pois tem implicações a nível de transfusões e de transplantes. Esta determinação baseia-se no fato de que os indivíduos apresentam anticorpos contra os antígenos que não possuem. Os antígenos são expressos ao nível da membrana eritrocitária e cada uma corresponde um anticorpo (anti-A e anti-B), que está ausente num soro de um sujeito com o respetivo antígeno nas hemácias. Desta forma, um indivíduo do grupo A apresenta o antígeno A e o anticorpo anti-B; do grupo B apresenta o antígeno B e o anticorpo anti-A; do grupo AB apresenta o antígeno A e o antígeno B e do grupo O apresenta os anticorpos anti-A e anti-B.

• Técnica de aglutinação em coluna - Ortho

Pode ser por execução manual ou ser executada no Sistema Auto Vue, usando os mesmos reagentes.

Princípio do método- A reação ocorre em microtubos que contêm micro-esferas e antissoros, num ambiente tamponado. As micro-esferas permitem a separação entre os eritrócitos aglutinados e os eritrócitos livres.

Como material utiliza: Centrifuga da Ortho (Ortho Bio Vue) com tempo e velocidade de centrifugação pré-estabelecidos pela casa comercial, pipeta automática de volume variável e respetivas pontas, pipetas de Pasteur descartáveis, tubos de plástico, suportes para tubos e cartões, luvas e contentor para material contaminado.

Utiliza como reagentes cassetes do grupo ABO/Rh da Ortho, eritrócitos A1 e B comerciais a 0,8 %, Cassetes reversa da Ortho e soro fisiológico. Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes de executar esta técnica.

A amostra de sangue total é colhida em tubo com EDTA K3, que é centrifugada a 3500 rpm durante 5 minutos.

Para determinação de Grupo celular ou prova direta

- Fazer uma suspensão de eritrócitos de 2 a 5% em soro fisiológico (1mL de soro fisiológico + 50 µL de glóbulos rubros concentrados),
- Identificar o cartão (dados do doente),
- Retirar a proteção de alumínio do cartão respetivo,

- Pipetar 10 µl desta suspensão de eritrócitos para cada microtubo,
- Centrifugar as cassetes na centrifuga do sistema Bio Vue Grupo sérico ou prova reversa,
- Identificar o cartão (dados do doente + localização das células),
- Retirar a proteção de alumínio do cartão respetivo,
- Pipetar 50 µL da suspensão de eritrócitos A1, B (previamente colocados à temperatura ambiente) para o microtubo correspondente,
- Pipetar 40 µL de soro ou plasma problema para cada microtubo,
- Centrifugar as cassetes na Centrifuga do sistema Bio-Vue.

A Leitura é feita, em que é possível observar-se os seguintes resultados:

1. **Resultado positivo**- aglutinados à superfície das microesferas ou ao longo da microcoluna.
2. **Resultado negativo**- todos os eritrócitos estão depositados no fundo da microcoluna.
3. **Mixed-field**- eritrócitos aglutinados formam um anel no topo do gel. Eritrócitos não aglutinados passam através das microesferas e formam um botão no fundo da microcoluna.

Qualquer discrepância entre os resultados do grupo celular e do grupo sérico, tem que ser resolvida antes de ser registado o grupo ABO. Se for necessária a administração de sangue a um doente, antes da resolução da discrepância ABO, este deve ser transfundido com sangue do grupo O.

Determinação do fator RH

O sistema Rh é um dos sistemas dos grupos sanguíneos mais complexos e também um dos mais importantes em termos transfusionais. Os antígenos do Sistema RH são altamente imunogénicos, mesmo em pequena dose. A designação RH Positivo aplica-se especificamente à presença do antígeno **D** e sua ausência é designada por **d**.

- **Técnica de aglutinação em coluna – Ortho**

A execução manual desta técnica pode ser executada no Sistema Auto Vue, usando os mesmos reagentes.

A reação ocorre em microtubos que contêm micro-esferas e antissoros, num ambiente tamponado. As micro-esferas permitem a separação entre os eritrócitos aglutinados e os eritrócitos livres.

Como material utiliza: centrífuga da Ortho (Ortho Bio Vue) com tempo e velocidade de centrifugação pré-estabelecidos pela casa comercial, Ortho pipeta automática de volume variável e respectivas pontas, pipetas de Pasteur descartáveis, tubos de plástico, suportes para tubos e cartões, luvas e contentor para material contaminado.

Como reagentes utiliza: cassetes do grupo ABO/Rh da Ortho e soro fisiológico. Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente antes de executar esta técnica.

A amostra é sangue total colhido em tubo com EDTA K3, que irá centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos, antes da execução da técnica.

Posteriormente procede-se à execução da técnica:

- Fazer uma suspensão de eritrócitos de 2 a 5% em soro fisiológico (1 mL de soro fisiológico + 50 µL de glóbulos rubros concentrados,
- Identificar o cartão,
- Retirar a proteção de alumínio do cartão e microtubos respetivos,
- Pipetar 10 µL desta suspensão de eritrócitos para cada microtubo (D, CDE, CTE).
- Centrifugar as cassetes na centrífuga do sistema Bio Vue.

Relativamente à Leitura (figura 79), pode obter-se:

- **Resultado positivo-** aglutinados à superfície das microesferas ou ao longo da microcoluna.
- **Resultado negativo-** todos os eritrócitos estão depositados no fundo da microcoluna.

Os doentes classificados desta forma, como Rh negativos, e quando candidatos a transfusão, devem ser transfundidos com sangue Rh negativo, evitando a pesquisa da variante D fraco.

Nas determinações em card, baseado no método de aglutinação direta, caso não ocorra a ligação antígeno-anticorpo, os eritrócitos migram até ao fim do tubo, enquanto que, se ocorrer, os complexos anticorpo-eritrócito ficam retidos no topo do microtubo (ou na sua extensão).

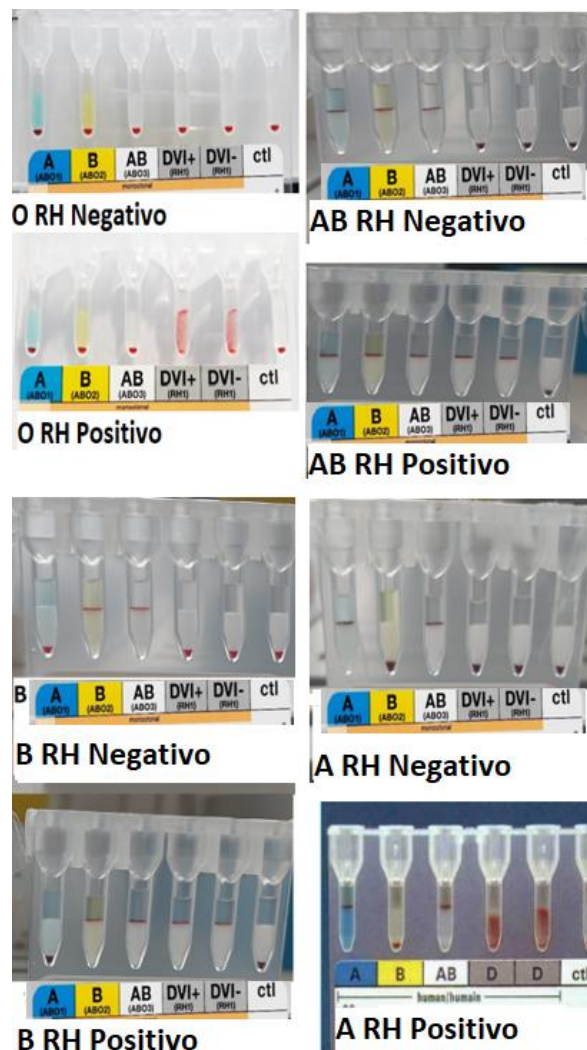


Figura 79- Interpretação dos diferentes grupos sanguíneos em cards.

Pesquisa do Aq D fraco, pela técnica de Anti-globulina Humana

Os resultados negativos obtidos em recém-nascidos, obrigam à pesquisa da variante D fraco, pela técnica de anti-globulina humana:

Técnica em cassete poliespecífico IgG; C3d-Ortho, em que é necessário:

- Identificar a cassete,
- Remover a película protetora,
- Juntar 40 µL de *Liss* a cada microtubo,
- Adicionar 10 µL de uma suspensão de eritrócitos em soro fisiológico a 3 % de cada uma das amostras a estudar,
- Juntar 40 µL de soro anti-D (IgG+IgM),
- Incubar 10 minutos a 37°C,
- Centrifugar na centrífuga Bio Vue.

Na Interpretação dos resultados:

- **Resultado positivo**- aglutinados à superfície das micro-esferas ao longo da microcoluna.
- **Resultado negativo**- todos os eritrócitos estão depositados no fundo do microtubo

Para classificação:

- Rh Positivo- resultado positivo em qualquer prova
- Rh Negativo- resultado negativo em ambas as provas

A validação deste resultado implica que a prova de Combs direta do recém-nascido seja negativa.

Em recém-nascidos e até aos 4-6 meses de idade, a pesquisa no soro de Anti-A e anti-B, não pode ser considerada válida, porque a totalidade destes anticorpos ou a sua maioria são de origem materna, com passagem através da placenta, portanto só se determina ABO/Rh por prova direta.

Os resultados de grupos ABO/RH negativos obtidos em recém-nascidos, obrigam à pesquisa da variante D fraco, pela técnica de anti-globulina humana.

7.3- Transfusões

Neste subsector podem existir dois tipos de pedidos:

- Para o próprio dia
- Para uma data programada

Todos os pedidos que chegam ao setor devem ser estudados, tendo em conta as suas características. Todos os pedidos devem chegar em modelos próprios, devidamente preenchidos, em que é de carácter obrigatório: Identificação (dados completos), código da pulseira, unidades pedidas, assinatura do médico responsável pelo pedido, assinatura do responsável da colheita e data. Caso um dos parâmetros não venha preenchido é motivo de rejeição.

Este pedido deve vir acompanhado por outro modelo, designado como guia de transporte, que tem como objetivo, garantir o envio das amostras e determinar o tempo de preparação de uma transfusão, que salvaguarda as duas entidades envolvidas, principalmente em situações muito urgentes.

O envio das unidades pretendidas deve ser em malas próprias, com 2 acumuladores e o *logger* de registo da temperatura. Deve ser registado o trajeto de envio das unidades para o exterior, com impresso próprio.

A receção de pedidos de transfusão e da respetiva amostra é fundamental para a segurança transfusional. Após a receção e tratamento administrativo na Secretaria, o pedido e a respetiva amostra são colocados num suporte no Laboratório de Imunohemoterapia.

O responsável pela preparação da transfusão, verifica se:

1. A requisição do pedido de transfusão está adequadamente preenchida (verificar assinatura do clínico que pede a transfusão e do flebotomista que colhe a amostra).
2. O pedido de transfusão e a amostra respetiva, têm informação suficiente que permita a identificação positiva do recetor (nome completo se necessário abreviado e data de colheita da amostra é obrigatório).

3. Os dados que identificam a amostra estão de acordo com os que constam no pedido.
4. O registo informático ARA foi efetuado, (etiqueta com nº de transfusão).
5. A amostra foi colhida nas condições adequadas, tubo de colheita, quantidade, presença de hemólise.
6. Se a amostra não é enviada juntamente com o pedido de transfusão (doente com transfusão anterior), verificar se existe no Setor de Imunohemoterapia uma amostra com menos de três dias.
7. Se alguma das condições definidas anteriormente não se verificar, esta deve ser esclarecida, antes da preparação das transfusões.

Caso algumas das condições definidas não se verifique, o técnico regista a ocorrência em impresso próprio e comunica ao administrativo, devolve-lhe o pedido e respetiva amostra até ser resolvida a anomalia detetada.

Após a confirmação dos dados que vem no pedido e a amostra correspondente estarem de acordo, procede-se ao registo no programa SIBAS, em que é gerada uma etiqueta com o número de requisição, no qual identifica o utente. Deve ser colocado no tubo e todos os testes devem ser realizados a partir desta etiqueta.

Preparação de unidades de Glóbulos Rubros

No caso de a Amostra pertencer a um novo recetor, prepara-se segundo etapas:

- Centrifugação da amostra à temperatura ambiente, a 3500 rpm, durante 5 minutos.
- Determinação do grupo ABO, utilizando dois cards diferentes, com prova celular e prova sérica numa determinação,
- Determinação do Rh (D), em duplicado, por dois cards diferentes,
- Pesquisa de anticorpos irregulares,
- Compatibilização entre os glóbulos rubros do dador e o soro ou plasma de recetor na transfusão de Concentrado de Glóbulos Rubros (CGR),
- Confirmação do Grupo ABO RH do CGR,

- Armazenamento no frigorífico durante sete dias da amostra de sangue do recetor.

No caso de a Amostra pertencer a um recetor conhecido:

Com grupo sanguíneo já introduzido no SIBAS, proceder como anteriormente, exceto:

- Confirmação do Grupo ABO e confirmação do RH (D), efetuados por um método com prova celular.

Preparação de Unidades de Plasma fresco congelado

O Plasma Fresco (PF) é utilizado para a correção de défices globais da hemostase.

O setor de Imunohemoterapia dispõe de dois tipos de plasma:

- Plasma Fresco Congelado submetido a tratamento pelo método de Solvente/Detergente e nanofiltração da Octaplas.
- Plasma Fresco Congelado com redução patogénica do IPST, Instituto português do sangue e da transplantação.

A transfusão de plaquetas está indicada em doentes com trombocitopenia e/ou trombocitopatia, com hemorragia ativa ou para a sua prevenção.

É necessário efetuar a determinação de grupo ABO e Rh e a pesquisa de anticorpos irregulares na amostra do recetor enviada juntamente com o pedido de transfusão.

O Plasma Fresco está armazenado congelado à temperatura de - 30°C a - 40°C, mantendo-se acondicionado nas embalagens comerciais. É necessário efetuar a determinação de grupo ABO e RH, bem como a pesquisa de anticorpos irregulares na amostra enviada juntamente com o pedido de transfusão. O Plasma deverá ser compatível no sistema ABO com os eritrócitos do recetor. Não são necessárias provas de compatibilidade para este componente.

Ao ser enviada a unidade deve sempre ir acompanhada da Folha de Registo da confirmação de administração de componentes sanguíneos. A unidade deve ser colocada no frigorífico até ao seu envio.

Preparação de concentrado plaquetário

A transfusão de plaquetas está indicada em doentes com trombocitopenia e/ou trombocitopenia, com hemorragia ativa ou para a sua prevenção. É necessário efetuar a determinação de grupo ABO e RH e a pesquisa de anticorpos irregulares na amostra do recetor enviada juntamente com o pedido de transfusão.

Os testes executados no setor para a preparação de uma transfusão são:

- Determinação grupo ABO/Rh (prova direta e reversa) - cassete -ABDD, reversa,
- Pesquisa e identificação de anticorpos irregulares- cassete poly c3d,
- Provas de compatibilidade-cassete poly c3d.

Execução de provas de compatibilidade entre dador/recetor

Tendo em conta a determinação do grupo e pesquisa de anticorpos irregulares, selecionar as unidades isogrupais. Fazer suspensão desses unidades (190uL de soro + 10uL tubuladuras). Colocar no Card poly C3cd , uma gota de BLISS, 10uL da suspensão das unidades e finalmente 40uL de plasma do recetor. Incubar 10´ e posteriormente centrifugar durante 5 minutos.

Fazer a leitura:

- se compatível- aglutinação no fim da coluna
- se incompatível -aglutinação ao longo da coluna.

Tabela 4-Execução das técnicas manuais de testes no setor.

Grupo ABO/Rh (card ABDD)	Prova reversa (card vazio)	Pesquisa de anticorpos irregulares (card Poly c3d)	Provas compatibilidade (card Poly c3d)
Suspensão com eritrócitos o recetor: 190ul soro+10ul = 200ul <u>10ul em cada poço do card ABDD</u> <u>Centrifugar 5'</u>	<u>50ul células A1 e B + 40ul plasma recetor</u> <u>Centrifugar 5'</u>	<u>50ul de células (1,2,3) + 40ul plasma o recetor</u> <u>Incubar 10' - centrifugar 5'</u>	Suspensão do eritrócito das tubuladoras (190ul+10ul->200ul) <u>40ul bliss+10 ul suspensão +40ul plasma</u> <u>Incubar 10'+centrifugar 5'</u>

8. Controlo de qualidade

É fundamental um controlo de qualidade rigoroso em todas as fases do processo analítico (pré-analítica, analítica e pós-analítica). Na fase pré-analítica o controlo de qualidade passa pelo correto atendimento dos utentes, identificação correta do utente e amostras a serem testadas, assim como a triagem correta dos produtos, que neste caso, no estágio foi possível colocar em prática as regras no setor da triagem.

Na fase pós-analítica o controlo recai principalmente na etapa de validação dos resultados, presente em todos os setores, nos quais pude observar. Na fase analítica, quando se fala em controlo de qualidade, surgem os conceitos de controlo de qualidade interno e externo.

O controlo de qualidade interno (CQI) consiste na análise de uma amostra controlo com valores conhecidos dos analitos, de forma a avaliar a precisão dos resultados. É realizado diariamente depois da manutenção inicial dos equipamentos e antes de se testarem as amostras nas quais se pretende determinar o analito de interesse.

Os resultados do controlo são gravados nos equipamentos e são construídas cartas de controlo de modo a analisar se os resultados se encontram dentro dos limites aceitáveis de erro (média mais ou menos dois desvios padrão), ficando tudo registado nas plataformas de controlo de qualidade do laboratório.

O controlo de qualidade externo (CQE) é um controlo interlaboratorial. Consiste na análise de uma amostra com valor desconhecido enviada pelo programa de avaliação externa de qualidade em que o laboratório está inscrito – Riqa e Neqa, como já foi referido.

Posteriormente, os resultados são comparados com os resultados obtidos por outros laboratórios. Com a participação no programa de avaliação externa da qualidade o laboratório pode assegurar que os seus resultados se aproximam o mais possível dos valores reais, conceito de exatidão.

9. Conclusão

A realização deste estágio profissional na Unilabs foi uma experiência bastante enriquecedora, uma vez que me permitiu dar continuidade ao trabalho que executo no posto de colheitas, que apenas integra a parte pré analítica. A noção do trabalho como um todo, permite perceber o quão importante é evitar erros de pré-analítica ou não execução de medidas simples e práticas, uma vez que, irá influenciar negativamente o trabalho no laboratório, dado o elevado volume de amostras.

O estágio foi bastante importante, onde pude consolidar a informação teórica que adquiri ao longo do mestrado em Análises Clínicas e permitiu adquirir novos conhecimentos, pela convivência com o pessoal profissional e qualificado de cada setor.

A Unilabs, equipada com aparelhos de topo, é um laboratório praticamente automatizado, sendo que as técnicas laboratoriais exigem pouco trabalho manual, porém de extrema importância. Um serviço automatizado evita erros nas determinações e as políticas de controlo de qualidade interna e externa, proporcionam resultados confiáveis aos utentes.

Referências

1. <https://www.beckmancoulter.com/products/automation/automate-2500-family-sample-processing-systems>
2. <https://www.eiken.co.jp/en/products/fit/pledia/>
3. <https://www.sysmex.com/la/pt/Products/Urinalysis/UN-SeriesUrinalysis/Pages/UN-Series-Urinalysis.aspx>
4. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9062>
5. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9086>
6. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9073>
7. https://www.neogen.com/globalassets/pim/assets/original/10000/7730_pt_pi.pdf
8. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22908>
9. <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9111>
10. https://commerce.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/56594_11_2003_PT.pdf
11. https://commerce.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/53647_2014_04_PT.pdf
12. https://commerce.biorad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/pt/63757_2016_03_PT.pdf
13. <https://repositorio.ul.pt/handle/10451/42087>
14. <http://www.biosystemsne.com.br/equipamentos/walkaway>
15. <https://www-speciation-net.translate.goog/Database/Instruments/Applied-Biosystems/API500LCMS;i578? x tr sch=http& x tr sl=en& x tr tl=pt& x tr hl=pt-PT& x tr pto=sc>
16. <https://a3analitica.com.br/bloga3pharma/2019/01/08/principios-de-cromatografia-a-liquido-hplc/>
17. <https://www-medicodistributors-in.translate.goog/siemens-bn-prospectsystem? x tr hl=pt-PT& x tr pto=sc& x tr sl=en& x tr tl=pt>
18. <https://www.scielo.br/j/abd/a/MTFwJfDtGwdGSpRqjWG4wty/?lang=pt&format=pdf>
19. <https://www.scienceinschool.org/pt-pt/article/2011/chemiluminescence-pt-pt/>
20. <https://www.euroimmun.co.jp/automation/immunoblot/euroblotone/>
21. <https://www-abacusdx-com.translate.goog/autoimmunity/phadia-250-allergy-autoimmunity/? x tr sl=en& x tr tl=pt& x tr hl=pt-PT& x tr pto=sc>

Monografia

Leucemia Mieloide Crónica-
Do diagnóstico à monitorização da doença

RELATÓRIO DE ESTÁGIO



Ana Luísa de Castro Vieira

Outubro 2022