



**M**

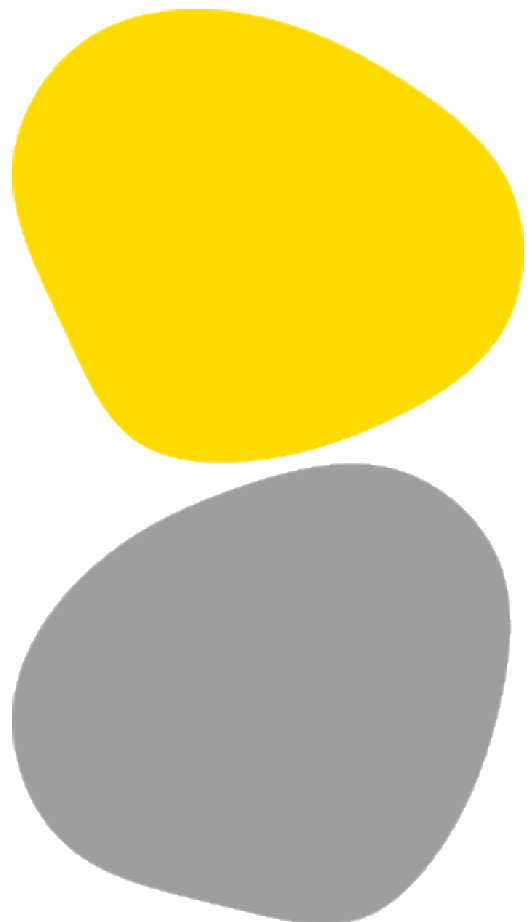
MESTRADO

MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

# Avaliação do rendimento dos reagentes nos coagulómetros ACL TOP® 550/750 e PFA-200® da ULS Santo António.

Carmélia Sofia Amaral Fonseca

09/2025





ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



**Avaliação do rendimento dos reagentes nos coagulómetros ACL TOP® 550/750 e PFA-200 da ULS  
Santo António.**

**Autor**

Carmélia Sofia Amaral Fonseca

**Orientadores**

Técnica Superior de Saúde Mónica Pereira/ Serviço de Imunohemoterapia, Unidade Local de Saúde do  
Hospital de Santo António

Professora Coordenadora Maria Manuela Amorim/ LAQV-REQUIMTE/Escola Superior de Saúde do  
Instituto Politécnico do Porto, Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública

Professora Adjunta Stephanie Lopes Ferreira/Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto,  
Especialista em Análises Clínicas e Saúde Pública

*Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública –Área de Especialização em Imunohemoterapia e Transplantação pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.*



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Dra. Sara Morais por me ter proposto o tema do estudo que realizei e ao Técnico Superior de Diagnóstico e Terapêutica (TSDT) Francisco Dias pela oportunidade de estagiar na Unidade de Trombose e Hemostase e pela disponibilidade constante.

Em especial, quero agradecer à TSS Mónica Pereira e ao TSDT Norival Pinho por aceitarem me orientar, por estarem sempre disponíveis para qualquer dúvida ou questão e por partilharem um pouco do seu enorme conhecimento comigo. Assim como agradecer a todos os TSDT da Unidade de Trombose e Hemostase, Lurdes Moreira, Rui Matos, Patrícia Freitas e Nilsa Gomes, pela confiança, pela paciência, pelo carinho e pelo companheirismo que demonstraram. Sem todos vocês não teria sido uma experiência tão enriquecedora.

Quero também agradecer a todas as pessoas do serviço de Imunohemoterapia pela forma como sempre me acolheram e incluíram.

De igual forma, agradeço às Professoras Stephanie Ferreira e Manuela Amorim, pela orientação, paciência, partilha de conhecimento e por acreditarem em mim.

Aos meus pais, que tornaram tudo isto possível, obrigada por tudo o que sempre fizeram para que eu tivesse as melhores oportunidades possíveis, por me encorajarem a realizar o mestrado e pelo amor incondicional.

À minha prima Catarina, obrigada por seres a minha segunda casa, e a toda a minha família pelo apoio e amor que sempre me mostraram.

Por último, quero agradecer às minhas amigas. Às de sempre, Cláudia e Francisca, pelos anos de amizade e por serem o meu lugar de conforto e tranquilidade. E às que estes dois anos me deram, Catarina, Beatriz e Beatriz, pelas conversas, pelos conselhos nos momentos de desânimo, pelas horas de estudo, pelos jantares, e por tornarem o percurso mais leve e agradável.



## Resumo

A gestão laboratorial envolve a utilização eficiente de recursos, pessoal e equipamentos, assegurando qualidade e conformidade legal, e permite adotar práticas de planeamento, manutenção e controlo que minimizam desperdícios e gastos desnecessários.

O estudo realizado na Unidade Local de Saúde de Santo António teve como propósito avaliar a rendimento dos reagentes nos coagulómetros ACL TOP® 550/750 e PFA-200® e, consequentemente identificar as principais causas de desperdício dos reagentes. A análise incidiu sobre testes de rotina, como o Tempo de Protrombina, Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada, D-Dímeros, Fibrinogénio e Anticoagulante Lúpico.

Na análise dos resultados permitiu concluir que o rendimento dos equipamentos ACL TOP® 550, ACL TOP® 750 e PFA-200® é globalmente satisfatório, com percentagens de desperdício relativamente baixas. No ACL TOP® 750, o reagente de D-Dímeros destacou-se pela baixa estabilidade e maior desperdício, apontando para a necessidade de otimização da sua utilização. Este estudo permitiu ainda constatar uma diferença expressiva entre o número de testes estimado pelo fabricante e o número de resultados efetivamente obtidos

Conclui-se que a gestão eficiente dos reagentes e a monitorização contínua do desempenho dos equipamentos são fundamentais para reduzir perdas, garantir sustentabilidade e assegurar a fiabilidade diagnóstica.

**Palavras-chave:** Hemostase; Coagulopatias; Gestão Laboratorial; Rendimento; Desperdício.



## Abstract

Laboratory management involves the efficient use of resources, personal, and equipment, ensuring quality and legal compliance, and allows for the adoption of planning, maintenance, and control practices that minimize waste and unnecessary expenses.

The study conducted at the Santo António Local Health Unit aimed to evaluate the efficiency of reagents in the ACL TOP® 550/750 and PFA-200® coagulometers and, consequently, identify the main causes of reagent waste. The analysis focused on routine tests, such as Prothrombin Time, Activated Partial Thromboplastin Time, D-Dimers, Fibrinogen, and Lupus Anticoagulant.

Analysis of the results led to the conclusion that the performance of the ACL TOP® 550, ACL TOP® 750, and PFA-200® devices is generally satisfactory, with relatively low waste percentages. In the ACL TOP® 750, the D-Dimer reagent stood out for its low stability and higher waste, pointing to the need to optimize its use. This study also revealed a significant difference between the number of tests estimated by the manufacturer and the number of results actually obtained.

It was concluded that efficient management of reagents and continuous monitoring of equipment performance are essential to reduce losses, ensure sustainability, and guarantee diagnostic reliability.

**Keywords:** Hemostasis; Coagulopathies; Laboratory Management; Efficiency; Waste.



## Índice

Capítulo I – Relatório de Estágio.....	1
1. Introdução.....	1
2. Fase Pré-analítica.....	2
3. Fase Analítica.....	4
3.1. Avaliação laboratorial da coagulação.....	7
3.2. Estudo de coagulopatias.....	14
3.3. Controlo de Qualidade.....	27
4. Conclusão.....	28
Capítulo 2 – Avaliação do rendimento dos reagentes nos coagulómetros ACL TOP® 550/750 e PFA-200® .....	29
1. Introdução.....	29
2. Material e métodos.....	30
2.1. Tipo de estudo.....	30
2.2. População e Amostra.....	30
2.3. Questões Éticas.....	31
3. Procedimento.....	31
3.1. Tratamento de Dados.....	34
4. Resultados e Discussão.....	35
4.1. Equipamento PFA-200®.....	35
4.2. Equipamento ACL TOP® 550.....	37
4.3. Equipamento ACL TOP® 750.....	40
4.4. Análise comparativa dos equipamentos ACL TOP® 550 e 750.....	44
5. Conclusão.....	46
Referências Bibliográficas.....	47
6. Anexo.....	55
Anexo 1.....	55
Anexo 2.....	55



## Índice de Figuras

Figura 1- Representação da hemostase primária .....	5
Figura 2- Representação da hemostase secundária .....	5
Figura 3- Representação do sistema fibrinolítico .....	6
Figura 4- Representação esquemática das vias da cascata da coagulação: via intrínseca (à esquerda), via extrínseca (à direita) e via comum (ao centro, em baixo) .....	7
Figura 5- Padrões de análise de multímeros plasmáticos do FVW: Tira 1 e 4- plasma normal; Tira 2- DvW tipo A; Tira 3- DvW tipo B.....	18
Figura 6- Análise comparativa do desperdício (A), rendimento (B) e do número de testes utilizados no CQI (C) entre os dois equipamentos.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## Índice de Gráficos

Gráfico 1- Número de repetições e motivo.....	36
Gráfico 2- Distribuição do número de testes teóricos calculados pela ULSSA e obtidos pela casa comercial.....	38
Gráfico 3- Percentagem de Rendimento obtida no laboratório em comparação com a da Casa Comercial .....	39
Gráfico 4- Distribuição da quantidade de testes teóricos calculados pelo laboratório e obtidos pela casa comercial.....	41

## Índice de Tabelas

Tabela 1- Correspondência entre parâmetros analíticos e equipamentos (28–36).....	8
Tabela 2- Alterações laboratoriais associadas aos subtipos da Doença de von Willebrand (74).....	17
Tabela 3- Resultados do equipamento PFA-200®.....	35
Tabela 4- Resultados do equipamento ACL TOP® 550.....	37
Tabela 5- Registos efetuados e resultado do cálculo de testes teóricos do equipamento ACL TOP® 550 .....	38
Tabela 6- Resultados calculados referentes ao equipamento ACL TOP® 550.....	39
Tabela 7- Resultados extraídos do equipamento ACL TOP® 750.....	40
Tabela 8- Registos e resultado do cálculo de testes teóricos do equipamento ACL TOP® 750.....	40
Tabela 9- Resultados referentes ao equipamento ACL TOP® 750.....	41
Tabela 10- Quantidade de volume morto e volume útil de cada reagente.....	43



## Lista de Abreviaturas

ACA	Anticorpos Anticardiolipina
ADAMTS13	do inglês, <i>Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 13</i>
ADP	do inglês, <i>Adenosine Diphosphate</i>
aFL	Anticorpos antifosfolípididos
Anti- $\beta$ 2GPI	Anticorpos anti- $\beta$ 2-glicoproteína I
APC	Proteína C ativada
APTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado
AT	Antitrombina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BSS	Síndrome de Bernard-Soulier
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
COL/ADP	Colagénio/ADP
COL/EPI	Colagénio/Epinefrina
CQ	Controlo de Qualidade
CQI	Controlo de Qualidade Interno
DD	D-Dímeros
dRVVT	Tempo de Veneno de Víbora Russell Diluído
DvW	Doença de von Willebrand
EB	Embolia Pulmonar
ELISA	do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FDPs	Produtos de Degradação da Fibrina
FIXa	Fator IX ativado
FT	Fator Tecidual
FT-FVII	Complexo Fator Tecidual-Fator VII
FV	Fator V
FVII	Fator FVII
FVIII	Fator FVIII
FvW	Fator de von Willebrand
FX	Fator X



FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXII	Fator XII
FXIII	Fator XIII
GPIb	Glicoproteína IB
GT	Trombastenia de Glanzmann
HMWK	Cinínogénio de Alto Peso Molecular
INR	do inglês, <i>International Normalized Ratio</i>
ISI	Índice de Sensibilidade Internacional
LA	Anticoagulante Lúpico
LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
MBPL	Manual de Boas Práticas Laboratoriais
PASU	Posto Avançado do Serviço de Urgência
PC	Proteína C
PF	Púrpura Fulminante
PFA	Teste de Função Plaquetária
PS	Proteína S
PT	Tempo de Protrombina
PTT	Púrpura Trombocitopénica Trombótica
RLU	Unidades relativas de Luz
SAF	Síndrome Antifosfolipídico
SIHT	Serviço de Imunohemoterapia
TEV	Tromboembolismo Venoso
t-PA	Ativadores do Plasminogénio do Tipo Tecidual
TR	Tempo de Reptilase
TT	Tempo de Trombina
TVP	Trombose Venosa Profunda
ULSSA	Unidade Local de Saúde Santo António
u-PA	Ativadores do Plasminogénio do Tipo Uroquinase



## Capítulo I – Relatório de Estágio

### 1. Introdução

Este relatório desenvolveu-se no âmbito da Unidade Curricular de Estágio do Curso de Mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública – ramo de Imunohemoterapia e Transplantação da Escola Superior de Saúde do Porto, realizado na Unidade de Trombose e Hemostase do serviço de Imunohemoterapia na Unidade Local de Saúde de Santo António.

#### 1.1. Caracterização do local de estágio

O Centro Hospitalar Universitário de Santo António, atualmente designado como Unidade Local de Saúde Santo António (ULSSA), recebeu os primeiros doentes em 1799, e é uma entidade de referência na prestação de cuidados de saúde diferenciados. É considerado um dos melhores centros hospitalares do país, do qual fazem parte um centro de inovação, ensino, investigação e formação. Ao longo dos anos colaborou com diversas instituições, sendo que, neste momento é composto pelo Hospital Geral Santo António e Centro Integrado de Cirurgia de Ambulatório (CICA), Hospital Magalhães Lemos, Centro Materno-Infantil do Norte Albino Aroso e Centro de Genética Médica Jacinto de Magalhães. Partilha ainda o Centro Académico Clínico com o Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (1–3).

O serviço de Imunohemoterapia (SIHT), onde está integrada a Unidade de Trombose e Hemostase, resulta da divisão do antigo Serviço de Hematologia Clínica, que integrava a Hematologia Clínica, e a Imuno-hemoterapia, em 2023. O SIHT está dividido em 4 unidades: a Unidade de Imuno-hematologia e Medicina Transfusional (UIHMT), a Unidade de Trombose e Hemostase, a Unidade de Diagnóstico Hematológico Margarida Lima (UDHML) que inclui os laboratórios de Citometria e Genética e a Unidade de Hemocromatose e Metabolismo do Ferro (UHMF). Este serviço funciona em três polos: um polo no ex-CICAP onde se encontram as Consultas Externas, Hospital de Dia e Laboratórios, um polo no piso 1 do Edifício Luís de Carvalho onde funciona o Posto Avançado do Serviço de Urgência (PASU) e, um no CMIN onde se localiza a área de colheita para Dadores de Sangue (4).

A Unidade de Trombose e Hemostase (UTH) possui quatro áreas fundamentais: o Laboratório de Trombose e Hemostase, as Consultas Externas de Coagulopatias, Hemostase, Trombofilia,



Hipocoagulação e Consulta Multidisciplinar de Musculo-Esquelética associada à Hemofilia e o Centro de Referência de Coagulopatias Congénitas, reconhecido como Centro de Referência Nacional pelo Ministério da Saúde, através do despacho Nº 6669/2017, publicado em Diário da República nº148/2017, Série II, de 2 de agosto de 2017. O Laboratório de Trombose e Hemostase é qualificado para o diagnóstico de hemofilias e outros défices raros de fatores de coagulação, doenças plaquetárias, doenças de interação endotélio-plaqueta, inibidores de fatores e monitorização terapêutica (5,6).

## **1.2. Contextualização do estágio**

O estágio e o estudo de caso realizaram-se na Unidade de Trombose e Hemostase, na ULSSA, no período compreendido entre 21 de outubro de 2024 a 31 de junho de 2025, completando um total de 492 horas. No decorrer do estágio, tive a oportunidade de colaborar nas diferentes áreas do serviço, participando não só na rotina diária do laboratório, como também em procedimentos que ocorrem ocasionalmente.

## **1.3. Objetivos do Estágio**

O período de estágio permitiu não só aplicar na prática os conhecimentos obtidos durante o Mestrado, principalmente na área da coagulação, relacionando os resultados obtidos com possíveis diagnósticos, como também adquirir novos conhecimentos e desenvolver destreza na prática e no laboratório. Durante este período, foi possível acompanhar as fases pré-analítica e analítica, bem como executar o processamento e a análise de amostras destinadas ao estudo de coagulopatias, trombofilias e à monitorização terapêutica.

## **2. Fase Pré-analítica**

A colheita de sangue é o procedimento que permite obter a amostra de sangue a analisar e é geralmente realizado através da punção venosa. No laboratório de Trombose e Hemostase, nos doentes seguidos em consultas de hipocoagulação, é prática habitual a punção capilar — esta técnica é usada para a monitorização do valor da Razão Normalizada Internacional (INR, do inglês *International Normalized Ratio*). A punção venosa é realizada em doentes com valores de INR usualmente alterados, ou para confirmação dos resultados da punção capilar.

Para os estudos de coagulação, a amostra recomendada é o plasma obtido por sangue total colhido em tubo que contém 3,2% de citrato de sódio, um anticoagulante que inibe a cascata da coagulação, atuando como um agente quelante, que ao se ligar ao ião cálcio bloqueia a sua atividade (7).



O cálcio, também denominado fator IV, encontra-se armazenado nos grânulos densos das plaquetas. Após a ativação plaquetária e consequente mudança conformacional, chamada *shape change*, o conteúdo dos grânulos é libertado para a corrente sanguínea, ativando a agregação das plaquetas (8). O íon cálcio facilita a ligação dos fatores de coagulação com os fosfolípidos das plaquetas, capacidade essa que lhe é conferida pelo ácido gama carboxiglutâmico. Este aminoácido resulta da carboxilação dos resíduos de ácido glutâmico pela vitamina K (7,9). Além disso, é essencial na formação dos complexos ativadores da protrombina e assim co-fator de vários fatores de coagulação (7). Para que a cascata da coagulação seja ativada e os testes laboratoriais possam ser executados, é necessário reverter a ação do anticoagulante. Para isso, o cloreto de cálcio, presente nos reagentes, é adicionado com o objetivo de neutralizar o citrato de sódio previamente utilizado (8).

Após a colheita, a amostra de sangue total é enviada para o Laboratório de Trombose e Hemostase, onde se realiza a admissão da amostra no sistema informático. É fundamental comparar os dados presentes no tubo com os apresentados no sistema e observar se a amostra respeita os cuidados pré-analíticos nomeadamente o tubo com o anticoagulante correto, a proporção sangue/anticoagulante, ausência de hemólise ou coágulo, hematócrito, a fim de assegurar a fiabilidade dos resultados. No caso dos testes da atividade anti-Xa, responsável pela monitorização do tratamento com heparina, é também importante verificar a hora da administração do fármaco ao utente, uma vez que a colheita apenas pode ser realizada 4 horas após a última toma (10). Na eventualidade de algum dos critérios pré-analíticos não ser respeitado, a amostra deve ser rejeitada no sistema informático, registando de forma explícita a causa da rejeição, de modo a prevenir a repetição das não conformidades.

Após a admissão no sistema, os tubos são separados de acordo com o tipo de análise requisitada e com a necessidade ou não de centrifugação:

#### Amostras sem centrifugação

Função plaquetária (PFA-200®) – a centrifugação não é recomendada, uma vez que as plaquetas seriam separadas do plasma ou poderia ocorrer ativação, levando à perda de função, comprometendo a validade do teste de função plaquetária. Após a colheita, o tubo de sangue total é colocado num agitador antes da realização da análise (11).

#### Amostras com centrifugação

Todas as restantes amostras são centrifugadas entre 1500-2000 rpm durante 15 minutos, a temperatura ambiente (18-24°C) (12) Posteriormente, cada amostra é direcionada para o equipamento adequado de acordo com os testes solicitados.



Para o estudo de trombofilias e coagulopatias, o plasma obtido por centrifugação é separado e distribuído por várias alíquotas e, em seguida congelado. Estas análises são executadas todas as terças e quartas-feiras, respetivamente, dia designado para a realização destes estudos.

As análises, como o teste de mistura, doseamento de inibidores, anticorpos anti-cardiolipina e anti- $\beta$ 2GPI, análise da distribuição dos multímeros do FvW, doseamento de ADAMTS 13 e avaliação da capacidade do FvW de se ligar ao colagénio (FvW:CBA), não são realizadas num dia específico. Assim, exceto em situações urgentes—nas quais o teste é efetuado no próprio dia—, o plasma é congelado após a centrifugação da amostra e os ensaios são posteriormente realizados quando existir número suficiente de amostras para preencher a capacidade total do equipamento.

### 3. Fase Analítica

A hemostase é uma sequência de eventos fisiológicos responsável por manter o sangue em estado líquido, por meio da ação dos anticoagulantes naturais e, simultaneamente, prevenir hemorragias em caso de lesão nos vasos sanguíneos, através da formação de um tampão hemostático, resultante da conversão de fibrinogénio em fibrina (13).

Este processo envolve cinco componentes principais, que atuam em três diferentes fases da coagulação, sendo elas a hemostase primária, onde se forma o tampão plaquetário, hemostase secundária, no qual o tampão pré-existente é reforçado e a fibrinólise, fase onde o coágulo é dissolvido de maneira a evitar possíveis fenómenos trombóticos (8).

A hemostase primária (Figura 1) inicia-se aquando da lesão dos vasos sanguíneos, momento em que o subendotélio é exposto e liberta a endotelina, que estimula a vasoconstrição, o colagénio e o fator tecidual (FT), responsáveis pela ativação das plaquetas e o fator de von Willebrand (FvW), essencial na adesão plaquetária. As plaquetas, aderem-se ao endotélio do vaso e são ativadas através da interação entre o colagénio, o FvW e a glicoproteína IB (GPIb). Consequentemente, ocorre uma alteração na conformação plaquetária, dá-se a expansão de pseudópodes e libertação do conteúdo dos grânulos alfa e densos, como tromboxano  $A_2$  (TXA<sub>2</sub>) e *adenosine diphosphate* (ADP), respetivamente, que posteriormente vão recrutar mais plaquetas. Esta primeira etapa leva à agregação das plaquetas e resulta na formação do tampão plaquetário (8,14).

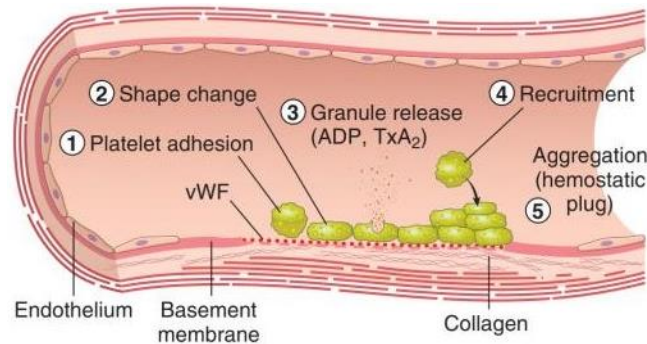


Figura 1- Representação da hemostase primária (15)

A função da hemostase secundária (Figura 2) consiste em fortalecer o tampão plaquetário. Nesse sentido, a cascata da coagulação, dividida em via extrínseca e intrínseca, que converge numa via comum, é ativada. Esta representa uma sequência de reações enzimáticas, onde existem substâncias iniciais, como o complexo FT-FVIIa, que ativam sucessivamente outros fatores de coagulação com o objetivo de gerar trombina. A trombina, por sua vez, converte o fibrinogénio em fibrina, que envolve os agregados plaquetários e estabiliza os tampões primários frágeis em tampões hemostáticos estáveis, com o auxílio do fator FXIII (FXIII) (8,16).

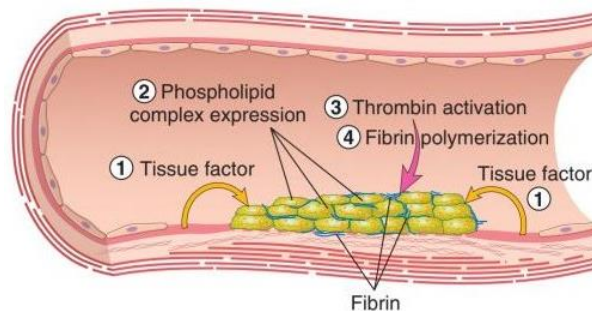


Figura 2- Representação da hemostase secundária (15)

Embora seja necessário um mecanismo rápido e eficiente que assegure a coagulação diante de lesões vasculares e que impeça a ocorrência de hemorragias graves, é crucial que haja um equilíbrio entre os elementos pró-coagulantes e anticoagulantes, a fim de evitar a formação excessiva de coágulos e permitir a sua remoção após a reparação do dano. Esse equilíbrio é mantido devido à existência de inibidores dos fatores de coagulação, dos quais os anticoagulantes naturais como a proteína C e S, a antitrombina (AT) e o inibidor da via do fator tecidual (TFPI), e da fibrinólise, a última etapa da coagulação (8,17).

O sistema fibrinolítico (Figura 3) é o processo responsável pela dissolução do coágulo de fibrina formado na hemostase secundária e é autoregulador. É composto pelos ativadores do plasminogénio, do



tipo tecidual (t-PA) e uroquinase (u-PA), que convertem o plasminogénio em plasmina, elemento responsável pela degradação da fibrina, e também por inibidores que impedem essa degradação. Nomeadamente, o inibidor do ativador do plasminogénio, a alfa 2-antiplasmina e o inibidor da fibrinólise ativável pela trombina (TAFI), que fortalece o coágulo de fibrina ao dificultar sua degradação pela plasmina. Da destruição da fibrina pela plasmina resultam os produtos de degradação da fibrina (FDPs), sendo que o mais conhecido é o D-Dímero (DD) (18,19).

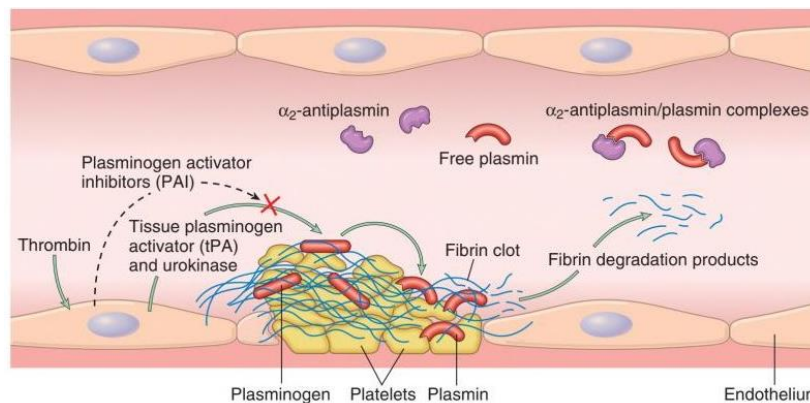


Figura 3- Representação do sistema fibrinolítico (15)

Estas três etapas principais, e todos os componentes do sistema hemostático, sejam eles pró-coagulantes ou anticoagulantes, devem estar constantemente em equilíbrio, dado que, qualquer instabilidade pode provocar fenómenos hemorrágicos ou trombóticos (15).

### Cascata da coagulação

Existem duas abordagens distintas para a compreensão da cascata de coagulação: o modelo clássico, que fundamenta grande parte da avaliação laboratorial nos dias de hoje, e o modelo celular. A diferença central entre ambos reside na conceção temporal e funcional das vias de coagulação. No modelo clássico, a via intrínseca, extrínseca e comum são consideradas sequenciais e discretas, com múltiplos elementos ativadores ao longo da cascata. Em contraste, o modelo celular propõe que as vias não são independentes, acontecem ao mesmo tempo e o complexo fator tecidual-Fator VII (FT-FVII) é o ponto inicial da cascata de coagulação. Além disso, neste último modelo, a contribuição das plaquetas é significativamente mais proeminente do que no modelo clássico (20)

Segundo o modelo clássico, a via intrínseca desencadeia-se quando o fator XII (FXII) é ativado por contacto com superfícies carregadas negativamente. Esta ativação é potencializada pela ação da pré-caliceína, libertada na sequência da lesão vascular, e pelo cinogénio de alto peso molecular (HMWK), que facilita a ativação do fator XI (FXIa) pelo FXIIa, enquanto a pré-caliceína é convertida em



calicreína. O FXIa, na presença do cálcio, promove a ativação do fator IX (FIXa) por proteólise, que consequentemente, sob influência do fator VIII ativado (FVIIIa), converte o fator X (FX) em FXa. A via extrínseca é desencadeada pela liberação do fator tecidual (FT) por células lesadas, que, em presença de  $Ca^{2+}$ , se liga ao fator VII circulante (FVII), ativando-o. O complexo FT-VIIa converte o FX em FXa sobre a superfície plaquetária, integrando a coagulação com a ativação celular. A ativação do FX por ambas as vias levam à formação do complexo protrombinase, constituído por FXa, fator V (FV) proveniente dos grânulos alfa plaquetários,  $Ca^{2+}$  e fosfolípidos, que inicia a via comum. Este complexo catalisa a conversão da protrombina (fator II, FII) em trombina, que, por sua vez, ativa o fibrinogénio (fator I, FI), promovendo a formação de fibrina, elemento essencial para a estabilização do tampão hemostático. Finalmente, FXIII transforma a fibrina solúvel em polímero insolúvel, ligando-a à alfa 2-antiplasmina e protegendo o coágulo da fibrinólise mediada pela plasmina (21–23).

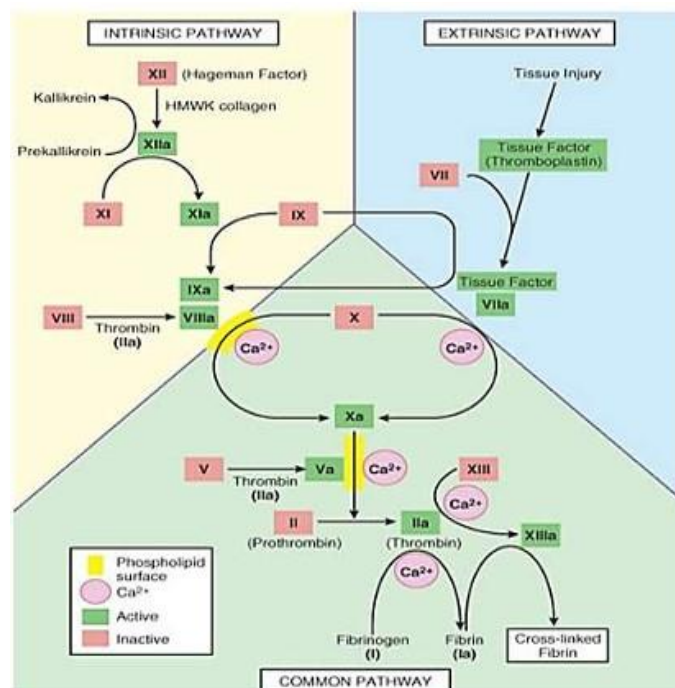


Figura 4- Representação esquemática das vias da cascata da coagulação: via intrínseca (à esquerda), via extrínseca (à direita) e via comum (ao centro, em baixo) (24)

### 3.1. Avaliação laboratorial da coagulação

No Laboratório de Trombose e Hemostase, estão disponíveis diversos equipamentos para atender aos pedidos de análises. A Tabela 1 apresenta a descrição dos parâmetros analíticos realizados em cada equipamento.



Tabela 1- Correspondência entre parâmetros analíticos e equipamentos (25–33)

Parâmetro Analítico	Equipamento	Metodologia
Tempo de Protrombina (PT) Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT) Teste de Mistura	ACL TOP® 550 (Werfen)	Coagulométrica
PT APTT Fibrinogénio D-Dímeros Tempo de trombina (TT) Tempo de reptilase (TR) Pesquisa do anticoagulante lúpico (LA); Doseamento de fatores II, V, VII, VIII, IX, X, XI Pesquisa Proteína C (PC), Proteína S (PS) e Antitrombina (AT) Doseamento de Inibidores Teste de Mistura	ACL TOP® 750 (Werfen)	Coagulométrica Cromogénica Imunológica
PT (com o reagente Thromborel® S) APTT (com o reagente Actin® FS) Doseamento fatores da via intrínseca Interação ristocetina e o fator de von Willebrand (FvW:Rco); antígeno do FvW (FvW:Ag) PS funcional	CN-3000 (Sysmex)	Coagulométrica Cromogénica Imunológica
Avaliação da função plaquetária	PFA-200® (Siemens)	Ensaio de agregação plaquetária "in vitro"
Anticorpos anti-cardiolipina e anti-β2GPI	Triturus (Grifols)	ELISA
Multímeros do FvW	HYDRASYS 2 (Sebia)	Eletroforese
ADAMTS 13	ACL AcuStar (Werfen)	Quimioluminescência
FvW:CBA	ACL AcuStar (Werfen)	Quimioluminescência
Agregometria plaquetária	Chrono-log Model 700	Quimioluminescência

O equipamento ACL TOP® 550 é ideal para laboratórios com um volume de amostras médio, e, no caso do laboratório de Trombose e Hemostase da Unidade Local de Saúde de Santo António, opera em conjunto com o analisador maior desta família, o ACL TOP® 750. A capacidade de processamento deste equipamento é de até 240 testes por hora (34).

O equipamento ACL TOP® 750 é a versão mais robusta do ACL TOP® 550, permite analisar mais de 270 amostras por hora e é indicado para laboratórios com um alto volume de amostras (34)



O método coagulométrico avalia o tempo necessário para o plasma coagular sob condições controladas, após a ativação da cascata de coagulação. Neste caso, o tempo de coagulação é determinado por turbidimetria, avaliando a mudança na densidade ótica da amostra. A turbidimetria mede a diminuição da transmissão da luz causada pela formação de partículas, no caso coágulos, e quantifica a luz residual transmitida (35)

O método cromogénico baseia-se na atividade enzimática de fatores específicos da coagulação. Utilizam o princípio colorimétrico, medindo a absorvância da luz gerada pela reação enzimática. A quantidade de luz que atinge o detetor e é convertida num sinal elétrico proporcional à atividade da enzima (35)

O método imunológico baseia-se na formação de complexos antigénio-anticorpo e permite determinar a concentração de um analito numa amostra. A medição é feita após mudança na densidade ótica, por turbidimetria (35).

A pesquisa do anticorpo lúpico é realizada através do uso do kit de dRVVT, que possui dois reagentes. O primeiro utilizado, dRVVT Screen, contém uma quantidade reduzida de fosfolípidos. Quando entra em contacto com o plasma do doente, se este possuir LA, os anticorpos interferem na formação do complexo protrombinase, prolongado o tempo de coagulação. Já o dRVVT Confirm, que é rico em fosfolípidos, neutraliza o anticorpo fornecendo uma superfície aumentada para a ligação do complexo protrombinase, resultando numa diminuição do tempo de coagulação (36,37).

A quantidade da proteína C é medida através de um teste cromogénico, no qual o plasma é incubado juntamente com um ativador da PC e, posteriormente misturada com um substrato cromogénico sintético. Após a sua libertação, é feita uma medição espectrofotométrica, sendo o nível de substrato diretamente proporcional à atividade da proteína C (69,70).

No doseamento da proteína S são utilizados dois reagentes, C4BP Latex e Anti PS MAb Latex, que contém um anticorpo monoclonal específico contra a PS livre. A reação entre esses reagentes provoca aglutinação, cujo aumento de turbidimetria é proporcional à concentração de proteína S livre no plasma. S ó a forma livre é ativa (72).

No teste cromogénico utilizado para medir a antitrombina, o plasma é incubado com um reagente que contém FXa e heparina em excesso. Quanto mais antitrombina estiver presente, mais FXa é inibido. Depois da incubação é adicionado um substrato cromogénico, com o qual o FXa residual irá reagir libertando um composto colorido. A intensidade da reação é inversamente proporcional à atividade da antitrombina (41).



O CN-3000 é um analisador automático de alto rendimento, que oferece uma ampla gama de ensaios e consegue processar até 450 testes de PT por hora (26)

O equipamento PFA-200® permite avaliar a função plaquetária. Para que ocorra o teste, o sistema exige que 800  $\mu$ L de sangue total anticoagulado com citrato de sódio seja aspirado para um reservatório presente nos cartuchos próprios, através de um capilar até uma membrana de teste. Essa membrana encontra-se impregnada com agonistas plaquetários, no caso Colagénio/Epinefrina (COL/EPI) ou Colagénio/ADP (COL/ADP), e simula a lesão vascular. Os agonistas, em contacto com o sangue que é aspirado sob vácuo, estimulam a adesão, ativação e agregação das plaquetas, levando ou não, à formação do coágulo. O momento exato em que o sangue coagula é chamado de tempo de oclusão (61). Os valores de referência dos cartuchos COL/EPI e COL/ADP são, respetivamente 82-150 segundos e 62-100 segundos. O tempo máximo para o qual o equipamento consegue fazer uma leitura são 300 segundos, portanto, amostras que atingem esse limite são registadas como 'no closure', indicando que não ocorreu formação do tampão plaquetário (33,43).

A deteção e quantificação dos anticorpos anticardiolipina (ACA) IgG e/ou IgM, é feita através do método de ELISA, utilizando uma cardiolipina altamente purificada e uma  $\beta$ 2-glicoproteína I humana. Quando a  $\beta$ 2GPI interage com a cardiolipina, forma-se um complexo que expõem novos epítomos que não estão disponíveis quando os dois elementos estão isolados. Os anticorpos reconhecem o complexo e ligam-se a ele. As amostras são adicionadas aos poços das microplacas que estão revestidas com o antigénio específico. Caso o ACA estiver presente, liga-se ao antigénio e as partes que não se ligaram são eliminadas na lavagem. Depois são adicionadas imunoglobulinas anti-humanas que se ligam ao complexo antigénio-anticorpo, e, mais uma vez, as não ligadas são eliminadas na próxima lavagem. A deteção dos anticorpos é feita por uma reação enzimática que gera cor. O substrato Tetrametil Benzidina, de cor azul, muda para amarelo após a adição de ácido. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra do paciente. Os resultados são expressos em GPL/mL e MPL/mL (27).

Os anticorpos anti- $\beta$ 2GPI têm como alvos os epítomos específicos da  $\beta$ 2-glicoproteína I humana, que só se tornam acessíveis quando a  $\beta$ 2-glicoproteína I interage com membranas lipídicas ou quando está ligada a outras superfícies, como por exemplo, a placa de microtitulação(28). O princípio do teste é também semelhante ao que ocorre no teste dos anticorpos anticardiolipina, tendo apenas a diferença do antigénio impregnado na microplaca ser específico para a  $\beta$ 2-glicoproteína I(28).

A agregometria plaquetária é realizada através de um teste que se baseia na adição de diferentes agonistas plaquetários a plasma rico em plaquetas (PRP), despoletando a ativação plaquetária, a



alteração da estrutura das plaquetas e a agregações primária e secundária. Esse processo diminui a absorção de luz e aumenta a transmissão. Essa diferença da transmissão de luz é detetada, e são geradas curvas de agregação, permitindo avaliar diferentes vias de ativação plaquetária (32). Diversos agonistas podem ser utilizados, de acordo com a suspeita do diagnóstico e os resultados de testes prévios, incluindo ADP, colagénio, ristocetina, epinefrina, ácido araquidónico, tromboxano, entre outros (44).

A atividade da ADAMTS13 é avaliada através de um imunoensaio quimioluminescente, técnica na qual há emissão de luz resultante de uma reação química, sem necessitar de uma fonte externa para ser estimulada (30,45). O ensaio HemosIL AcuStar ADAMTS13 Activity da Werfen, ocorre em duas etapas:

1. A amostra é introduzida num cartucho que contém tampão de ensaio e partículas magnéticas revestidas por um substrato recombinante, o peptídeo VWF73 contendo local de clivagem Tyr1605–Met1606. A ADAMTS13 presente na amostra, cliva esse substrato e, após separação magnética e lavagem, é adicionado um anticorpo monoclonal marcado com isoluminol, que reconhece o peptídeo clivado;
2. Após nova separação magnética e lavagem, são adicionados dois reagentes despoletadores, resultando numa reação de quimiluminescência medida pelo sistema ótico ACL AcuStar (30).

O resultado é expresso em unidades relativas de luz (RLU), sendo que a intensidade de RLU é diretamente proporcional à atividade de ADAMTS13 (30).

### **3.1.1. Estudo sumário da coagulação**

#### **Tempo de Protrombina**

O PT é um teste de rastreio que determina o período, em segundos, decorrido entre a adição do reagente composto por tromboplastina e cálcio, e a formação do coágulo. Permite detetar alterações na via extrínseca e a via comum, uma vez que avalia os fatores II, V, VII, X e o fibrinogénio (46).

O PT possibilita a avaliação da função hepática, uma vez que o fígado sintetiza alguns dos fatores de coagulação vitamina k dependentes avaliados neste teste, II, VII, X, controla a terapia anticoagulante oral, principalmente a varfarina, um anticoagulante antagonista da vitamina K, e o diagnóstico de deficiências dos fatores de coagulação, congénitas ou adquiridas (47,48).

Considerando a existência de grande variabilidade nos resultados de PT, a Organização Mundial de Saúde propôs o uso do INR, obtida pela razão do valor de PT do doente por um PT controlo, elevado ao



Índice de Sensibilidade Internacional (ISI). O ISI é fornecido pela casa comercial. O cálculo é realizado automaticamente pelo aparelho(46).

O resultado é expresso em segundos (s), percentagem (%) ou INR. Os valores de referência utilizados na Unidade de Trombose e Hemostase, no ULSSA, encontram-se entre 9 e 12,7 segundos, para o PT, e entre 0,82 e 1,15 referente ao INR. Importa notar que em certas circunstâncias, como no caso do doente possuir próteses cardíacas, os limites normais podem ser ajustados.

O aumento dos valores de PT pode estar associado a deficiência de fatores de coagulação da via extrínseca ou vitamina K, insuficiência hepática, uso em excesso de anticoagulantes, inibidores adquiridos de fatores de coagulação, coagulação intravascular disseminada (CID). Já a diminuição pode indicar uma má colheita da amostra ou administração intravenosa de FVII (49).

### **Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado**

O APTT determina o tempo de coagulação a partir do momento em que o plasma da amostra entra em contacto com o cálcio, depois de incubar com reagente, constituído por fosfolípidos sintéticos com um ativador por contacto, no caso sílica. Este teste avalia os fatores da via intrínseca (FXII, FXI, FIX, FVIII), comum (FI, FII, FV, FX), e ainda a pré-caliceína e o HMWK. É igualmente útil na monitorização da terapêutica com heparina e na deteção do anticoagulante lúpico (50,51).

Os valores de referência variam entre 20,1 e 34,6 e expressam-se em segundos.

O APTT encontra-se prolongado em casos de doença de von Willebrand (DvW), hemofilia A devido à deficiência de FVIII e hemofilia B pela falta de FIX, doença hepática com consequente redução da vitamina K, coagulação intravascular disseminada, presença de LA e sobredosagem de heparina, considerando que o aumento do APTT é proporcional à quantidade do medicamento. A redução do tempo pode indicar que a colheita foi má realizada ou que houve administração de fatores (50).

### **Quantificação do Fibrinogénio**

O fibrinogénio, ou Fator I, é uma glicoproteína da via comum da cascata de coagulação que, ao ser clivada pela trombina dá origem à fibrina, elemento responsável pelo reforço do tampão hemostático no fim da hemostase secundária (52).

Este fator é quantificado através do método de Clauss, que consiste na avaliação da formação de fibrina após diluir a amostra, e acrescentar um reagente que contém trombina em excesso. Este excesso leva a que a velocidade da reação dependa apenas da concentração do fibrinogénio. Posteriormente, o



resultado é comparado com uma curva padrão de plasmas com concentrações conhecidas de fibrinogénio (53).

No laboratório, o intervalo de normalidade situa-se entre 1,66 a 3,53 g/L.

O fibrinogénio desempenha um papel importante na avaliação de doenças como a CID, disfunção hepática, quadros inflamatórios, visto ser uma proteína de fase aguda, e neoplasia malignas. Concentrações elevadas podem significar aumento de risco de doenças cardiovasculares, enquanto a sua diminuição pode estar associada à CID ou a terapêutica antitrombótica (53).

### **Tempo de Trombina**

À semelhança do fibrinogénio, o TT também estuda a parte final da cascata da coagulação, medindo o tempo de formação do coágulo desde a adição de trombina ao plasma do doente. Avalia a conversão do fibrinogénio em fibrina, sendo um teste quantitativo e também qualitativo (54).

Os valores de referência deste teste encontram-se no intervalo de 13,8 a 17,5 segundos.

O tempo de trombina é sensível à heparina, pelo que o aumento do TT pode estar associado à administração do anticoagulante parentérico, assim como a disfibrinogenemia, situação onde a estrutura ou função do fibrinogénio é modificada, deficiência de fibrinogénio ou níveis elevados de FDP's (55).

### **Tempo de Reptilase**

O TR é um ensaio de coagulação semelhante ao tempo de trombina, que utiliza uma enzima derivada da víbora *Bothrops atrox*, a batroxobina, para converter o fibrinogénio em fibrina(56).

Em virtude de ser independente de distúrbios na geração de trombina ou na sua ação sobre o fibrinogénio, o TR é ideal para diferenciar prolongamentos do TT causados por heparina de deficiências no fibrinogénio. Assim, quando o TT está prolongado, mas o TR se mantém normal, indica que a heparina é a causa da dificuldade na conversão da fibrina(56).

### **D-Dímeros**

A última etapa da cascata de coagulação consiste no reforço do tampão hemostático pela fibrina e FXIII. Contudo, quando o coágulo deixa de ser necessário, precisa de ser degradado para permitir a restauração do fluxo sanguíneo normal, dando início à fibrinólise. Os ativadores do plasminogénio, u-PA e t-PA, convertem o plasminogénio em plasmina, que depois dissolve o coágulo, originando produtos de degradação da fibrina, entre os quais os D-dímeros (57).



O teste dos DD apresenta alta sensibilidade e elevado valor preditivo negativo, permitindo praticamente excluir doença quando o resultado é negativo, desde que avaliado em conjunto com a informação clínica (57,58).

Para os DD, a medição é realizada por meio do ensaio imunoturbidimétrico e pelo reagente HemosIL® D-dímero HS 500 (59).

Podem ocorrer valores elevados em presença de trombose venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (EB) e CID, acidente vascular cerebral (AVC), COVID-19 e mordida por cobra venenosa. Há outras situações nas quais os níveis de D-dímero podem aumentar sem estarem associados a uma doença, como é o caso da gravidez, tabagismo, idade avançada, uso de contraceptivos orais, doenças autoimunes, entre outras(57).

### **3.2. Estudo de coagulopatias**

Coagulopatia é o termo utilizado para todas as alterações ou distúrbios da hemostase. Podem manifestar-se na forma hemorrágica ou na forma trombótica, se desencadearem a formação excessiva de coágulos. Também podem ser classificadas como congénitas ou adquiridas, dependendo do momento em que a doença se manifesta (60).

#### **3.2.1. Patologias hemorrágicas**

##### **Síndrome de Bernad-Soulier**

A síndrome de Bernard-Soulier (BSS), também conhecida por Distrofia Trombolítica Hemorrágica, é uma condição genética rara, que provoca o défice ou disfunção do complexo GPIb-IX-V. Este complexo encontra-se na superfície das plaquetas e é essencial para a adesão plaquetária, uma vez que a sua principal função é ligar-se ao fator de von Willebrand, e iniciar uma cascata de sinalização que ativa a integrina plaquetária GPIIb-IIIa, promovendo a agregação plaquetária. Contribui para a formação do coágulo devido à sua ligação à trombina (61).

A mutação nos genes que codificam o complexo GPIb-IX-V pode provocar redução da ativação das plaquetas, comprometimento da adesão plaquetária e, conseqüentemente, capacidade inadequada de formação do coágulo (61).

Os principais sintomas da BSS são epistaxise, equimoses, hemorragia cutâneo, hemorragia cerebral após traumatismo craniano, hemorragia prolongado após procedimentos dentários e menorragia em mulheres, mas também pode ocorrer hemorragia gastrointestinal e hematúria (61).



Do ponto de vista laboratorial, a síndrome é caracterizada por trombocitopenia, plaquetas gigantes, tempo de hemorragia prolongado, valores de PT e APTT dentro do intervalo de referência, visto que a BSS não afeta os fatores de coagulação. Já no teste de agregometria plaquetária apresenta uma resposta normal ao colagénio e ao ADP, e reduzida para a ristocetina, um antibiótico que induz e testa a ligação do complexo GPIIb-IX-V ao FvW (61,62).

A agregometria plaquetária, apesar de ser um procedimento demorado, continua a ser utilizada para avaliar a função plaquetária *in vitro*, e é executado no equipamento Chrono-log Model 700 (32).

### **Trombastenia de Glanzmann**

A trombastenia de Glanzmann (GT) é um distúrbio hemorrágico congénito resultante do defeito ou deficiência da integrina plaquetária GPIIb-IIIa. Após a ativação das plaquetas, a GPIIb-IIIa assume a sua configuração ativa e liga-se ao fibrinogénio, permitindo a agregação plaquetária e, conseqüentemente, a hemostase primária. Se a integrina não for funcional ou não estiver em quantidade suficiente, o fibrinogénio não se consegue ligar às plaquetas, podendo resultar em hemorragia (63).

Os sinais clínicos da GT são semelhantes aos da BSS: epistaxise, hemorragia gengival, menorragia nas mulheres, hemorragia gastrointestinal e, ainda que raramente, hemorragia intracraniana (63,64).

Em relação aos achados laboratoriais, a contagem de plaquetas usualmente dentro do intervalo de referência, em casos de hemorragia grave pode haver diminuição da hemoglobina e aumento da amplitude de distribuição das hemácias devido à deficiência de ferro. Os testes de coagulação, PT e APTT, encontram-se geralmente dentro dos valores de referência, o teste de função plaquetária (PFA) apresenta tempo de oclusão prolongado, >300 segundos, e, enquanto a agregação com a ristocetina apresenta uma resposta normal, quase todos os agonistas tem uma agregação diminuída, principalmente o colagénio, que depende do complexo fibrinogénio-GPIIb/IIIa para se ativar (32,44,64).

### **Doença de von Willebrand**

A doença de von Willebrand (DvW) é a patologia hemorragia congénita mais comum e é causada por defeitos na concentração, estrutura ou função do fator de von Willebrand (FvW) (65). O FvW é uma glicoproteína multimérica responsável por mediar a adesão e agregação plaquetária, desempenhando assim um papel crucial na hemostase. É sintetizada nas células endoteliais e nos megacariócitos e armazenada nos grânulos alfa das plaquetas (65). Após a lesão vascular, o FvW liga-se ao colagénio, bem como ao complexo GPIIb-IX-V, recrutando novas plaquetas. Após a adesão plaquetária, a integrina



GPIIb-IIIa colabora com o FvW na formação do tampão, por meio da ligação ao fibrinogénio. Além disso, o FvW funciona como proteína transportadora do FVIII, protegendo-o da degradação no plasma (64,65).

Existem 3 tipos diferentes da DvW, subdivididos em:

- Tipo 1: défice quantitativo no qual há uma deficiência parcial do FvW. Tipo de DvW mais frequente, ocorrendo em 70-80% dos doentes;
- Tipo 2: défice qualitativo, onde o FvW é disfuncional. Corresponde a cerca de 20% dos casos desta doença.

2A: ocorre um defeito na multimerização devido à ausência ou diminuição dos multímeros de alto peso molecular, resultando na redução da adesão plaquetária (65,66);

2B: resulta na ligação aumentada ao recetor plaquetário GPIb e maior sensibilidade à ativação pela ristocetina, provocando a ligação espontânea do FvW às plaquetas, mesmo sem estímulo vascular, o que resulta no aumento da agregação e diminuição das plaquetas circulantes (67);

2N: a alteração funcional do FvW impede a sua ligação ao FVIII, resultando na eliminação acelerada deste fator e na redução de seus níveis plasmáticos, o que pode levar a uma apresentação clínica semelhante à hemofilia A (68);

2M: caracterizada pela ligação defeituosa à glicoproteína GPIb ou colagénio, sem haver deficiência de multímeros de alto peso molecular (66)

- Tipo 3: défice total de FvW (65)

Todos os tipos de DvW resultam num fenótipo hemorrágico, devido ao papel essencial do FvW na hemostase primária e secundária. Os sintomas mais comuns são hematomas abundantes, hemorragia orofaríngea, menorragias nas mulheres, epistaxise, hemorragia articular, gastrointestinal, entre outros(65).

Nos exames de rastreio, o hemograma, o PT e o APTT demonstram normalmente valores dentro do intervalo de referência. Em casos mais graves o APTT pode estar prolongado e pode ocorrer trombocitopenia no tipo 2B (65). Para avaliar a capacidade de ligação do FvW às plaquetas, realiza-se o teste de função plaquetária (PFA), que apresenta tempo de oclusão prolongado em casos de DvW (51).



O PFA é realizado no equipamento PFA-200® da Siemens Healthineers e torna possível avaliar a função das plaquetas em condições de pressão, semelhante ao que acontece nos vasos sanguíneos, e também detetar dificuldades na adesão e agregação plaquetária (33).

Após os exames de *screening*, é necessário realizar testes mais específicos para classificar o tipo de DvW, nomeadamente a determinação de:

- FvW:Ag: mede a quantidade de FvW no plasma por métodos imunológicos, independentemente de este se encontrar funcional ou disfuncional. É útil para diferenciar o tipo 1 do 2, sendo que o tipo 1 apresenta uma razão FvW:Rco/FvW:Ag normal e o tipo 2 uma razão de <0,7.
- FvW:FVIII:B: usado para a determinação quantitativa da capacidade de ligação do FvW ao FVIII. Uma capacidade inferior a 20% sugere DvW tipo 2N;
- FvW:Rco: baseia-se na interação induzida pela ristocetina entre o FvW e a glicoproteína GPIb;
- FvW:CBA: avalia a capacidade do FvW se ligar ao colagénio e deve ser realizada em casos de suspeita de DvW tipo 2A, 2B ou 2M;
- FVIII:C: mede a atividade funcional do FVIII e permite avaliar como o distúrbio do FvW interfere na sua estabilidade.

A combinação dos resultados obtidos em cada parâmetro permite classificar a DvW, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2– Alterações laboratoriais associadas aos subtipos da Doença de von Willebrand (70)

Ensaio	Valores normais	Valores diminuídos
FvW:Rco	Indivíduos sem doença DvW tipo 1	DvW tipo 2A e 2B Maioria dos casos de DvW tipo 2M
FvW:CBA/Ag	Indivíduos sem doença DvW tipo 1 Maioria dos casos de DvW tipo 2M	DvW tipo 2A e 2B Alguns casos de DvW tipo 2M
FVIII:C/FvW:Ag	Indivíduos sem doença DvW tipo 1 Maioria dos casos de DvW tipo 2 (2A, 2B, 2M)	DvW tipo 2N Hemofilia A



- A aglutinação plaquetária induzida pela ristocetina, denominado RIPA, possibilita a identificação ou exclusão de alterações na atividade plaquetária induzida por ristocetina resultantes de mutações de ganho de função nos genes do FvW ou GPIB, ambos com hipersensibilidade à ristocetina. Aglutinação em concentrações baixas de ristocetina sugere DvW tipo 2B.
- A análise dos multímeros do FvW permite analisar a distribuição dos seus diferentes tamanhos. Nos tipos 2A e 2B observa-se alteração dos multímeros, enquanto no tipo 2M estes são normais (65,69–71).

Os monómeros de FvW, que possuem um peso molecular de aproximadamente 250 kDa, ligam-se por pontes dissulfeto, dando origem a multímeros cada vez maiores. Os multímeros são classificados de acordo com o seu peso molecular, baixo, médio e alto, podendo variar entre 500 a 20000 kDa (29).

O FvW é libertado para corrente sanguínea a partir dos grânulos alfa, sob a forma de multímeros de alto peso molecular (HMWM). O potencial hemostático e trombogénico dos multímeros é diretamente proporcional ao seu tamanho, uma vez que, quanto maiores forem, mais sítios de ligação ao colagénio e às plaquetas possuem. Contudo, os HMWM são clivados pela protease plasmática ADAMTS13, em multímeros menores, com menor potencial hemostático (29).

A análise da distribuição dos diversos multímeros do FvW é realizada através de eletroforese à base de gel de agarose e imunofixação, no equipamento HYDRASYS 2 da empresa Sebia. O analisador multifuncional HYDRASYS 2 SCAN FOCUSING realiza a migração, lavagem, coloração e leitura de forma integrada e automática, de modo a quantificar as frações de proteínas. Os kits utilizados são fornecidos pela casa comercial, e existe a opção de kit com 5 amostras e outro com 11 (72).

Os resultados dessa análise são apresentados como um conjunto de bandas correspondentes aos diferentes multímeros, chamado perfil de bandas de multiméricos (Figura 5) (29).

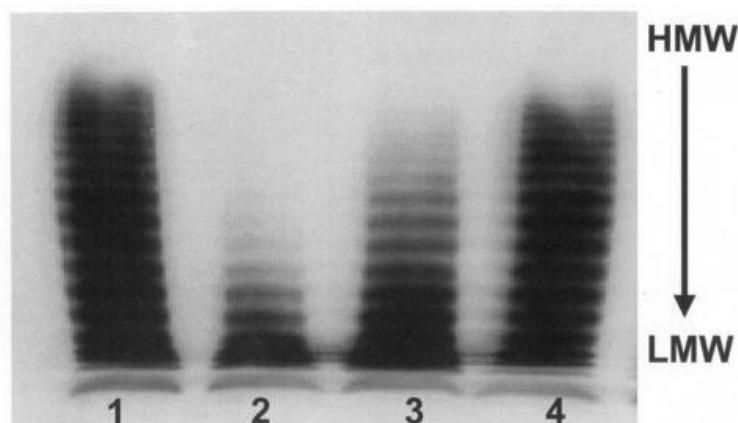


Figura 5- Padrões de análise de multímeros plasmáticos do FvW: Tira 1 e 4- plasma normal; Tira 2- DvW tipo A; Tira 3- DvW tipo B (73)



A avaliação dos multímeros do FvW permite saber que:

- Perda de multímeros de alto e intermédio peso molecular: está associado a DvW tipo 2A, 2B ou tipo plaquetário;
- Sem perda de multímeros de alto e intermédio peso molecular: ocorre na DvW do tipo 1, 2M, 2N ou em indivíduos sem DvW;
- Amostras sem qualquer FvW: classifica a DvW em tipo 3 (70)

### **Hemofilia A**

A Hemofilia A é uma doença hemorrágica hereditária ligada ao cromossoma X, causada pela deficiência do fator VIII, e é o tipo de hemofilia mais comum. Este fator atua na via intrínseca da coagulação e é responsável por ativar o FX, etapa fundamental para a formação da trombina e, conseqüentemente, da fibrina (74)

Por estar ligada ao X, a doença afeta predominantemente os homens, embora as mulheres possam ser portadoras assintomáticas (74).

A severidade da hemofilia A depende da quantidade de fator VIII presente, sendo classificada como leve quando há entre 5% e 40% de atividade, moderada entre 1% e 5% e grave quando o fator é inferior a 1% (75).

A hemofilia grave geralmente manifesta-se nos primeiros meses de vida, ocorrendo sintomas como hemorragia intracraniana espontânea em recém-nascidos, hemorragia excessivo após circuncisão, hemartrose dolorosa não traumática, equimoses inexplicáveis e hemorragias musculocutâneas após vacinação intramuscular. Em adolescentes e adultos, a hemartrose é a manifestação mais comum. Episódios recorrentes de hemorragias articulares podem resultar em artropatia hemofílica, uma lesão crónica e dolorosa que compromete a qualidade de vida. A hemorragia intracraniana é a complicação mais grave, podendo causar sequelas neurológicas graves e permanentes (74).

Laboratorialmente, a hemofilia A caracteriza-se por um hemograma e PT normais, com APTT prolongado. O doseamento do FVIII é crucial para o diagnóstico, apresentando níveis reduzidos proporcionalmente à gravidade da deficiência. Juntamente com o doseamento, também é necessário realizar um teste de mistura, de modo a perceber se a diminuição do FVIII acontece realmente devido à deficiência do fator ou pela presença de um inibidor (74,76).



Na unidade de Trombose e Hemostase, o FVIII é doseado no equipamento CN-3000 da Sysmex.

## **Hemofilia B**

A Hemofilia B é a segunda forma mais comum de hemofilia e é causada por uma mutação no gene *F9*, que resulta na produção insuficiente do fator IX. A mutação pode estar ligada ao cromossoma X ou pode ocorrer com uma mutação de novo (77).

Tal como na hemofilia A, a deficiência de fator provoca uma ineficiência da via intrínseca da cascata da coagulação, comprometendo a formação da rede de fibrina e o reforço do tampão hemostático (77)

Na hemofilia grave, onde os doentes têm menos de 1% de atividade de fator, as hemorragias surgem nos primeiros meses de vida, podendo surgir após circuncisão, vacinação ou lesões na boca. Ao longo do crescimento, sistema nervoso central, trato gastrointestinal, articulações, boca e músculos tornam-se locais comuns de hemorragia. Na hemofilia moderada, os níveis de fator encontram-se entre 1 e 5%, e as hemorragias ocorrem após trauma, lesão, procedimentos odontológicos ou cirurgias. Nos casos leves de hemofilia B, o FIX apresenta uma atividade entre 5 e 40% e o hemorragia espontâneo é raro, ocorrendo geralmente apenas após traumas significativos ou cirurgias (77)

Através de testes laboratoriais, sabe-se que normalmente o hemograma e o PT encontram-se normais e há um prolongamento do APTT. Quando o doseamento do FIX mostra uma atividade inferior a 40% o diagnóstico é praticamente confirmado (77).

## **Hemofilia Adquirida**

A hemofilia adquirida é uma doença hemostática autoimune rara causada pelo desenvolvimento de autoanticorpos, geralmente contra o FVIII, mas também podem ser dirigidos a outros fatores de coagulação. Ao contrário das hemofilias congénitas, os inibidores da hemofilia adquirida surgem espontaneamente, sem exposição prévia ao fator. Em vez de neutralizarem totalmente o fator, como nas hemofilias A e B, os autoanticorpos inibem o fator progressivamente (78,79).

Este distúrbio manifesta-se maioritariamente em adultos, sem afetar um sexo específico, e pode surgir devido a doenças autoimunes, estado pós-parto, doenças hematológicas ou oncológicas, doenças dermatológicas, medicação, doenças infecciosas, complicações relacionadas com transplante, doenças gastrointestinais e pulmonares (78).



A doença caracteriza-se por equimoses extensas e dolorosas, hemorragias nas mucosas, hemorragias internas sem histórico prévio, hematomas musculares, gastrointestinais, na próstata e pulmão, e podem provocar anemia devido à perda de sangue (78,79).

As análises laboratoriais revelam uma contagem de plaquetas e PT normal, enquanto o APTT se encontra aumentado 2 a 3 vezes em relação ao seu valor normal. Após a realização de teste de mistura, o APTT não normaliza, sugerindo a presença de um inibidor. É importante dosear o anticoagulante lúpico, uma vez que ele causa prolongamento do APTT que não corrige no teste de mistura. Os autoanticorpos contra o FVIII são os mais comuns, sendo por isso necessária a avaliação da atividade funcional deste fator, FVIII:C, que estará reduzida em relação aos valores normais (78,79)

Por fim, é necessário quantificar a potência do inibidor, através do teste de Bethesda, onde o plasma do doente é misturado com um plasma de controlo e diluído sucessivamente. Após incubação a 37°C durante 2 horas, a atividade do FVIII é novamente medida, sendo esperado que aumente progressivamente com as diluições, pois o plasma de controle também contém FVIII e o inibidor não consegue neutralizar todo o fator. A quantidade de inibidor, expressa em unidades Bethesda, corresponde à diluição do plasma do paciente capaz de reduzir em 50% a atividade do fator VIII (79).

### **Teste de Mistura**

O teste de mistura consiste em combinar o plasma do paciente com plasma normal padrão. É indicado em casos de prolongamento inesperado dos testes de coagulação, como o PT e o APTT, para auxiliar na identificação da presença de inibidores ou deficiência de fatores (76).

Em geral, misturam-se os dois plasmas num tubo, numa proporção de 1:1, utilizando-se aproximadamente 200 µL de cada – mix. Também se prepara um tubo com 400 µL de plasma padrão normal, que funciona como controlo positivo, permitindo comparar os resultados com os da mistura contendo o plasma do doente, e assim determinar se ocorreu correção do tempo de coagulação. O plasma normal padrão é preparado na Unidade de Trombose e Hemostase, e provém das dádivas de sangue. Idealmente, o plasma deverá provir de no mínimo 20 dadores, com níveis de fator e contagem de plaquetas normais (76).

A mistura é submetida aos mesmos testes que anteriormente apresentaram resultados anormais, e pode ser imediatamente testada ou pode ser incubada a 37°C durante 2 horas, e posteriormente analisada. No caso de suspeita de alterações no FVIII, a mistura deve ser sempre incubada, visto que a atividade do FVIII é dependente de tempo e temperatura (76).



Na unidade de Trombose e Hemostase, a existência de correção é avaliada comparando o tempo do teste de coagulação do mix com plasma normal padrão. Se a diferença entre os dois for inferior a 8 segundos, indica deficiência de fator, se for superior a 8 segundos, sugere a presença de um inibidor contra o fator (76).

Se houver deficiência na quantidade de fator, a mistura gera um resultado normal, pois o plasma normal padrão fornece quantidade suficiente do fator para compensar o que está em falta. No caso de estar presente um inibidor, o resultado continua anormal, visto que atua tanto no plasma do paciente como no normal (76).

### **Doseamento de Inibidor**

O teste de Bethesda foi desenvolvido para detetar e quantificar o título de aloanticorpos de FVIII em pacientes com hemofilia A congénita, mas também é útil no diagnóstico de autoanticorpos contra o FVIII em casos de hemofilia adquirida. Além disso também pode identificar inibidores de outros fatores de coagulação (80).

Este ensaio é realizado quando, após o teste de mistura, o tempo de coagulação não corrige, sendo por isso necessário avaliar a quantidade de fator que é inibido pelo anticorpo. Para tal, é necessário o plasma do doente, plasma normal, que serve como fonte de fator de coagulação, e uma solução tampão, como o fator diluente, usada nas diluições (79).

O procedimento deste teste encontra-se no anexo 1.

Os valores em percentagem de FVIII e as respetivas diluições são colocados num gráfico, através do qual surge uma curva de calibração que nos permite perceber qual a unidade Bethesda do inibidor.

1 unidade Bethesda é definida como a quantidade de inibidor que neutraliza 50% do FVIII, ou seja, a diluição que na curva de calibração corresponde a 50% de FVIII corresponde a 1 unidade Bethesda (79,80).

## **3.2.2. Patologias Trombóticas**

### **Deficiência da Proteína C**

A deficiência da proteína C consiste num distúrbio incomum em que a atividade da proteína C, uma protease plasmática dependente de vitamina K, encontra-se reduzida (39).

A proteína C ativada, forma ativa da proteína C (PC), regula negativamente a coagulação ao clivar e inativar os fatores de coagulação V e VIII. A sua carência, compromete a inativação desses fatores,



levando à produção descontrolada de trombina e, conseqüentemente, coágulos sanguíneos – trombofilia. Além disso, desempenha papel na regulação da inflamação e sépsis (39).

A condição pode surgir de forma congênita, através de mutações no gene *PROC*, que resultam em níveis reduzidos de PC ou em perda de funcionalidade. Trata-se de uma condição genética autossômica dominante, na qual indivíduos homocigotos para a mutação apresentam sintomas com poucos meses de vida e manifestam formas mais graves da doença, como púrpura fulminante (PF) e coagulação intravascular disseminada (CID). A PF causa trombose de pequenos vasos, resultando em necrose cutânea e subcutânea. A doença pode igualmente manifestar-se por causas adquiridas, associadas geralmente a hepatopatias, a terapêutica anticoagulante oral e a coagulação intravascular disseminada (39)

Os sintomas, em deficiências moderadas, podem não surgir até à adolescência. Contudo, episódios de tromboembolismo venoso (TEV), incluindo trombose venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (EP), além de predisposição a CID, AVC e trombose associada à gravidez, podem ser recorrentes (38,39).

### **Deficiência da Proteína S**

A deficiência da proteína S é uma condição muito pouco frequente caracterizada pela diminuição da atividade dessa proteína dependente da vitamina K, que circula no plasma em baixas concentrações. A proteína S (PS) desempenha um papel crucial na regulação da coagulação, nos processos inflamatórios e na apoptose, e é cofator da proteína C ativada. Portanto, a sua deficiência pode levar à formação excessiva de coágulos, aumentando o risco de tromboembolismo venoso (TEV) (81).

Este distúrbio pode ser de origem hereditária ou adquirida. A deficiência congênita de proteína S ocorre devido a mutações no gene *PROS1*. Assim como a proteína C, a deficiência de proteína S é uma condição autossômica dominante que pode causar púrpura fulminante em recém-nascidos. A deficiência adquirida geralmente está associada a doença hepática, síndrome nefrótica ou deficiência de vitamina K (81).

A proteína S circula no plasma em duas formas: PS livre (40%) e ligada à proteína transportadora da fração C4b do complemento C4bBP (60%), estando em equilíbrio dinâmico(40).

Os níveis da proteína S podem ainda ser afetados por terapias com antagonistas da vitamina K, lúpus eritematoso sistêmico, distúrbios mieloproliferativos, CID, uso de anticoncepcionais orais. Estes últimos e a gestação poderão estar associados a um risco maior de TEV(81).



As manifestações clínicas mais frequentes são trombose venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (EP) e predisposição para CID. Ocasionalmente, também pode surgir trombose cerebral, visceral ou em veias axilares e ainda perdas fetais nas mulheres (81).

### **Deficiência da Antitrombina**

A deficiência da antitrombina, ainda que rara, é considerada a mais grave dos distúrbios relacionados com anticoagulantes naturais. A antitrombina (AT) é o principal regulador da coagulação e inibe a trombina e todas as proteases procoagulantes, FIIa, FIXa, FXa, FXIIa e o FVIIa quando ligado ao fator tecidual (82).

Tal como nas outras patologias trombóticas, a deficiência da AT pode ser de origem congénita ou hereditária. O AT é codificado pelo gene *SERPINC1*, e as mutações causam dois tipos de deficiência: o tipo 1, caracterizado por defeito quantitativo; e o tipo 2, onde a AT tem a sua função comprometida. Os doentes afetados são geralmente heterozigotos, visto que a homozigotia implica baixa probabilidade de sobrevivência, provocando trombozes neonatais (82).

A escassez de AT provoca uma significativa heterogeneidade clínica, dependendo de fatores ambientais, tipo de deficiência e fatores genéticos. Contudo, é comum ocorrer TVP e EP, sintomas habituais das trombofilias (82).

### **Síndrome Antifosfolipídico**

A síndrome do anticorpo fosfolipídico é uma doença autoimune sistémica caracterizada por trombose arterial e/ou venosa e complicações na gravidez, associadas a mecanismos trombóticos e inflamatórios mediados por anticorpos antifosfolipídicos (aFL). Esta síndrome encontra-se frequentemente associada ao lúpus eritematoso sistémico (LES) (83,84).

Os aFL são autoanticorpos dirigidos contra fosfolípidos ou complexos fosfolípido-proteína, particularmente aqueles que contêm a  $\beta$ 2-glicoproteína I ( $\beta$ 2GPI) (84). A  $\beta$ 2GPI regula a coagulação, reduzindo a geração de trombina em situações que favorecem a trombose, e inibindo a ativação da proteína C. Além disso, exerce um papel importante na regulação da ativação e agregação das plaquetas (85). Os aFL podem ser anticorpos:

- Anti- $\beta$ 2GPI: dirigidos contra a  $\beta$ 2GPI;
- Anticoagulante lúpico: associado ao LES que atua contra complexos de fosfolípidos e proteínas, como a protrombina e  $\beta$ 2-glicoproteína I (86);



- Anticardiolipina: a cardiolipina é um fosfolípido, componente da membrana mitocondrial. A ligação de anticorpos anticardiolipina aos fosfolípidos provoca ativação plaquetária (87).

A SAF tem como manifestações clínicas mais comuns o TEV, AVC, abortos precoces recorrentes ou perdas gestacionais tardias, manifestações dermatológicas, comprometimento renal entre outras. Embora raro, também pode ocorrer SAF catastrófica onde há comprometimento de várias órgãos e trombose generalizada (83,88).

Laboratorialmente, observa-se o aumento do APTT, frequentemente acompanhado de trombocitopenia, anemia e proteinúria, refletindo o carácter sistêmico da síndrome. Para o diagnóstico, inicia-se com o Tempo de Veneno de Víbora Russell Diluído (dRVVT), destinado a identificar a presença do anticoagulante lúpico (LA) (36,83,88)

O dRVVT é um ensaio que permite a deteção do anticoagulante lúpico, um anticorpo associado a alterações na coagulação do sangue, como a SAF. O veneno da víbora Russel contém uma enzima que ativa diretamente o FX no início da via comum. Sendo assim, o dRVVT não é afetado por défices de fatores da via intrínseca e extrínseca, uma vez que não necessita deles para que a via comum ocorra. Uma vez ativado, o FXa, na presença de fosfolípidos, cálcio e do FVa, converte a protrombina em trombina. A trombina, por sua vez, transforma o fibrinogénio em fibrina, promovendo a coagulação (36,37).

Caso os tempos de coagulação do dRVVT Screen e Confirm estejam prolongados, deve-se realizar um teste de mistura para despistar deficiências de fatores ou inibidores. É de notar que o uso de antagonistas da vitamina K (VKA) pode gerar resultados falso-positivos (36,37).

Adicionalmente, podem ser realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para detetar anticorpos anticardiolipina e anti- $\beta$ 2GPI, utilizados como testes complementares para confirmação diagnóstica (87).

Na unidade de Trombose e Hemostase, este ensaio é realizado no equipamento Triturus da Grifols.

### **Púrpura Trombocitopénica Trombótica**

A púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) é um distúrbio raro que ocorre devido à diminuição ou deficiência total da protease ADAMTS13, tanto por causas congénitas como por adquirida. Esta enzima é responsável por fragmentar os multímeros de alto peso molecular do FvW, sendo que, quando está em níveis baixos pode levar à formação de microtrombos, causando isquemia e lesão em diversos órgãos (89,90)



A PTT adquirida é a mais comum e resulta do desenvolvimento de autoanticorpos, que podem estar associados ao uso de medicação antiplaquetária, agentes imunossupressores, HIV, contraceptivos orais ou gravidez. Os indivíduos com estes autoanticorpos, normalmente permanecem assintomáticos até que um evento como infeção ou gravidez desencadeie a condição (89).

Os principais órgãos afetados pela PTT são o sistema nervoso central e os rins. A anemia hemolítica microangiopática, juntamente com febre, trombocitopenia, disfunção renal e neurológica são as principais características deste distúrbio (89).

A PTT é uma situação onde há risco de vida devido à alta taxa de mortalidade de cerca de 90%. Daí ser necessário um diagnóstico rápido (89).

Em termos de avaliação laboratorial, inicialmente são realizados os exames de PT e APTT. Quando há suspeita de PTT é feita a quantificação da atividade da enzima ADAMTS13. Além disso, o teste de mistura para a ADAMTS13 é útil, pois auxilia a diferenciar se o distúrbio é congénito ou adquirido (89)

A atividade da ADAMTS13 é avaliada através de um imunoensaio quimioluminescente.

### **3.2.3. Monitorização da terapêutica anticoagulante**

O teste anti-Xa mede a atividade de anticoagulantes que inibem o fator Xa, essencial na via comum da cascata de coagulação. Inicialmente a heparina era monitorizada através do APTT, contudo, diversas interferências comprometiam o resultado. Por essa razão, iniciou-se o uso deste ensaio, que apresenta a vantagem de não sofrer interferência do anticoagulante lúpico, de doenças hepáticas, de estados inflamatórios agudos ou de coagulopatias (91).

Este teste permite supervisionar o tratamento de anticoagulantes como a heparina não fracionada, heparina de baixo peso molecular, mas também dos DOAC's como o apixabano, rivaroxabano e edoxabano (92).

A heparina é, na atualidade, o tratamento principal para doenças tromboembólicas, como síndrome coronária aguda, AVC, TVP e EP (91).

No ensaio laboratorial, é adicionado ao plasma do doente um reagente com excesso de fator Xa e um substrato cromogénico. A heparina, após a administração, liga-se à antitrombina (AT) criando um complexo que inibe o FXa. Esse complexo só consegue inibir parte do FXa adicionado, uma vez que se encontra em quantidade anormal, e o restante interage com o substrato cromogénico, produzindo uma coloração (91,93).



A intensidade da cor produzida é inversamente proporcional à quantidade de heparina presente. Os valores são comparados com uma curva padrão, e a atividade anti-Xa corresponde à concentração de heparina (91).

### **3.3. Controlo de Qualidade**

Nos laboratórios clínicos, o controlo de qualidade (CQ) tem como principais objetivos assegurar a exatidão e a fiabilidade dos resultados, garantindo que estes representem de forma rigorosa o estado clínico dos doentes. Paralelamente, o CQ contribui para a melhoria contínua dos processos laboratoriais e para a redução de erros ou falhas que possam comprometer tanto a validade dos resultados como a segurança do doente (94,95)

De acordo com o Manual de Boas Práticas Laboratoriais de Patologia Clínica ou Análises Clínicas (MBPL), aprovado pelo Despacho n.º 10009/2019, de 5 de novembro, a implementação de um sistema de qualidade é essencial para assegurar uma atividade adequada e o exercício profissional rigoroso nos laboratórios, que envolvem múltiplas atividades e profissionais com diferentes competências. O MBPL não tem como objetivo definir métodos específicos para a execução dos exames laboratoriais — uma vez que a responsabilidade técnica, científica e organizacional cabe a cada instituição —, mas sim promover a uniformização da implementação da qualidade em todos os laboratórios (96).

A Unidade de Trombose e Hemostase é certificada pela Norma NP EN ISO 9001, na qual uma entidade independente verifica que o produto, serviço, sistema de gestão ou outro processo fornecido atende aos requisitos estabelecidos (97)

O controlo de qualidade interno (CQI) consiste no conjunto de procedimentos postos em prática num laboratório com vista a permitir um controlo da qualidade dos resultados dos exames laboratoriais ao longo de todo o processo analítico. Esta avaliação possibilita a deteção de erros nos métodos e equipamentos usados na rotina do laboratório e correção de possíveis erros (96).

Os laboratórios têm a responsabilidade de estabelecer as diretrizes para a avaliação do QCI e a manutenção dos equipamentos, determinando a frequência dessas ações e os critérios a avaliar, de acordo com o volume de análises requisitadas. Os controlos, são amostras de concentrações conhecidas, geralmente cedidas pelas casas comerciais, que verificam a precisão dos resultados (96,98)

Os resultados das análises de controlo são normalmente apresentados em gráficos de Levey-Jennings, permitindo observar de forma rápida se os valores se mantêm dentro dos intervalos de referência, com base no desvio-padrão. Além disso, as Regras de Westgard auxiliam na validação e



interpretação desses resultados. Ambos os elementos auxiliam na identificação de erros analíticos, que podem ser aleatórios, surgindo de forma imprevisível e inevitável, ou sistemáticos, ocorrendo de maneira constante e regular, comprometendo a exatidão dos resultados (99)

O controlo de qualidade externo (CQE) refere-se à avaliação da qualidade dos resultados do laboratório por uma entidade externa. Por meio de ensaios interlaboratoriais, é possível verificar a exatidão dos resultados, avaliar a eficácia do CQI, monitorizar o desempenho dos métodos utilizados e melhorar os padrões nacionais (96,100,101)

A unidade de Trombose e Hemostase está integrada em dois programas de controlo externo de qualidade, o *United Kingdom National External Quality Assessment Service* e o *External Quality Assessment Programme*, ambos internacionais.

#### **4. Conclusão**

O estágio desenvolvido na Unidade de Trombose e Hemostase revelou-se extremamente enriquecedor. Para além de consolidar os conhecimentos adquiridos em contexto académico sobre coagulação e hemostase, possibilitou também o desenvolvimento de competências técnicas. Acima de tudo, constituiu uma experiência pessoal marcante e inesquecível.



## Capítulo 2 – Avaliação do rendimento dos reagentes nos coagulómetros ACL TOP® 550/750 e PFA-200®

### 1. Introdução

A gestão laboratorial refere-se à administração eficiente dos recursos, operações e pessoal, garantindo o funcionamento contínuo e sustentável da unidade. É um processo complexo e exigente, que engloba a monitorização e organização dos vários elementos do laboratório como supervisão de profissionais, o cumprimento das normas legais, o controlo de inventário e respetivos orçamentos, bem como a manutenção de equipamentos. Estes elementos devem ser monitorizados com cautela, a fim de evitar desperdícios, atrasos, riscos à segurança e resultados não conformes (102).

Garantir o uso eficaz desses recursos representa uma gestão competente e pode melhorar a produtividade e reduzir desperdícios, ou uso indevido de consumíveis, e tempo de trabalho. O conceito de eficiência laboratorial baseia-se não apenas na redução de desperdícios, mas também na capacidade de alocar recursos de forma estratégica, de acordo com indicadores de desempenho previamente definidos. (102,103)

No entanto, é inevitável a existência de alguns gastos extras nos laboratórios. Exemplos incluem os controlos internos e externos, que são fundamentais para a implementação de procedimentos destinados a identificar, prevenir e corrigir falhas, garantindo a confiabilidade dos resultados, e também as calibrações, responsáveis por assegurar a precisão dos equipamentos. Estes gastos que são invisíveis nas respostas aos pedidos analíticos são custo inerente, contudo são fundamentais para a garantia de qualidade de todo processo do qual resulta a validação dos resultados (104).

Por outro lado, outros gastos são potencialmente evitáveis, como: repetições de testes para confirmação de resultados, diluições, perda de estabilidade de reagentes, que pode levar não só à repetição do teste como também do controlo, volume morto de reagentes ou falha súbita do equipamento. A adoção de medidas como planeamento rigoroso do uso de reagentes, monitorização sistemática do desempenho dos equipamentos, validação de protocolos de diluição e aplicação de programas de manutenção preventiva pode reduzir significativamente estas perdas (104)

O cálculo da percentagem de desperdício, em conjunto com a análise do rendimento, permite uma análise abrangente da eficiência laboratorial. Enquanto o primeiro permite identificar os testes mais propensos a erros, permitindo desenvolver estratégias de otimização, o segundo possibilita avaliar a eficiência do uso dos reagentes e o impacto das medidas implementadas (104). Este tipo de abordagem



quantitativa é fundamental para assegurar que as estratégias de otimização têm tradução prática em termos de economia de recursos e de sustentabilidade. Para além da análise de perdas, este tipo de estudo também oferece a oportunidade de avaliar de forma mais rigorosa as necessidades específicas de aquisição de reagentes, determinando a frequência de abertura de novos reagentes e o número real de testes realizados por cada um. Esta informação é particularmente relevante no contexto da crescente pressão económica sobre os serviços de saúde, exigindo um equilíbrio entre custos e qualidade (105)

O presente estudo surge da necessidade da Unidade de Trombose e Hemostase identificar as principais causas do desperdício de reagentes e promover a sua rentabilização, sem comprometer a qualidade dos resultados.

Este projeto tem como objetivo calcular o rendimento e o desperdício dos reagentes utilizados para a realização dos testes de rotina nos equipamentos PFA-200® e ACL TOP® 550 e 750.

## **2. Material e métodos**

### **2.1. Tipo de estudo**

Este trabalho consiste num estudo observacional transversal e analítico, realizado na Unidade de Trombose e Hemostase da ULS Santo António.

### **2.2. População e Amostra**

A população deste estudo consistiu nos reagentes utilizados nos coagulómetros ACL TOP® 550 e 750 e PFA-200® para a realização de testes de rotina. A amostra foi constituída pelos reagentes utilizados nos coagulómetros ACL TOP® 550 e 750 e PFA-200® para a realização de testes de rotina, nomeadamente o PT, o APTT, os D-Dímeros, o Fibrinogénio e o Anticoagulante Lúpico (dRVVT C e dRVVT S), durante o período de 21 de janeiro a 20 de fevereiro de 2025 e segundo os seguintes critérios:

#### **Critérios de inclusão:**

- Todos os reagentes utilizados em testes de rotina, nos equipamentos referidos, no período 21 de janeiro a 20 de fevereiro de 2025;
- Reagentes com registos completos, como a data de abertura e de descarte do reagente;

#### **Critérios de exclusão:**

- Reagentes que não foram utilizados durante o período do estudo ou de uso único;
- Reagentes sem rastreabilidade completa durante o período de análise;
- Reagentes utilizados no equipamento CN-3000, por não haver informação completa;



- Reagentes aplicados em testes complementares ou não de rotina.

### 2.3. Questões Éticas

A realização deste estudo não necessitou de ser submetida à Comissão de Ética da ULS Santo António, uma vez que não envolveu a recolha, utilização ou análise de dados clínicos ou pessoais de doentes. O estudo incidiu exclusivamente sobre o consumo de reagentes e o desempenho dos respetivos equipamentos, não implicando, por conseguinte, qualquer risco ou impacto direto para os doentes. Foram cumpridos todos os princípios de confidencialidade e integridade científica, assegurando que não ocorreu recolha ou tratamento de informação suscetível de identificar indivíduos.

### 3. Procedimento

Inicialmente procedeu-se à recolha sistemática da informação relativa à estabilidade temporal e ao volume teórico de cada reagente (volume total do frasco, preparado conforme instruções da bula ou pronto a usar), tal como indicado nas respetivas bulas dos fabricantes. Estes dados foram compilados e organizados numa tabela em formato digital, garantindo uma base de referência padronizada para as análises subsequentes.

#### Registo no equipamento PFA-200®

O equipamento PFA-200® não dispõe de base de dados que permita a extração automática dos parâmetros relevantes. Por este motivo, foi implementado um sistema de registo manual para todas as amostras processadas. Para cada amostra, documentou-se o tipo e número de cartuchos utilizados, a quantidade consumida e o número de resultados efetivamente reportados ao requisitante. Em situações de repetição de ensaios, registou-se adicionalmente o motivo subjacente, assegurando a rastreabilidade integral de cada ocorrência.

#### Registo nos coagulómetros ACL TOP® 550 e 750

Durante o período de estudo, os reagentes processados nos equipamentos ACL TOP® 550 e 750 foram monitorizados de forma sistemática. Para cada frasco, registaram-se:

- a data de abertura,
- o número de testes realizados, conforme indicado pelo equipamento,
- o volume residual (volume morto) remanescente após a sinalização de frasco vazio pelo equipamento,
- a data de descarte.



O volume morto foi quantificado através de quatro medições independentes com micropipeta, sendo posteriormente calculada a média para reduzir variações pontuais. Este procedimento permitiu determinar de forma mais robusta tanto o volume residual como o número efetivo de testes realizados por frasco.

### Extração e tratamento dos dados

Após o término do período de recolha, os registos de execução de ensaios foram exportados diretamente dos equipamentos, em ficheiros individuais no formato Excel. A partir destes ficheiros, foram extraídos dados referentes a:

- número total de testes e controlos realizados,
- ocorrência de repetições,
- identificação de testes não concluídos.

Nos casos de testes pendentes, procedeu-se à análise da causa subjacente. Considerou-se consumido o reagente sempre que a pipetagem tivesse ocorrido, ainda que o ensaio não produzisse resultado válido (ex.: falhas técnicas ou resultados fora do intervalo de deteção). Em contrapartida, situações em que o ensaio não chegou a ser iniciado por insuficiência de volume da amostra ou irregularidades pré-analíticas não foram contabilizadas como consumo.

Os ensaios classificados como desperdiçados incluíram repetições de testes e falhas técnicas que impossibilitaram a obtenção de resultado válido. Os controlos repetidos, por serem indispensáveis à validação analítica, não foram considerados desperdício, assim como as calibrações, cuja execução é obrigatória para garantir o desempenho do equipamento.

### Reagentes estudados

No equipamento PFA® 200 foram estudados os cartuchos:

- COL/EPI: possui os agonistas plaquetários colagénio e epinefrina é sensível ao uso de aspirina/anti-inflamatórios;
- COL/ADP: composto por colagénio e adenosina-5'-difosfato (ADP) e é útil para diferenciar defeitos de plaquetas de efeito medicamentoso (106).

No equipamento ACL TOP® 550 foram estudados os reagentes:

- RecombiPlasTin, tromboplastina de elevada sensibilidade, baseado no fator recombinante de tecido humano que determina quantitativamente o PT (107).



- SynthASil, reagente fosfolipídico sintético responsável pela determinação *in vitro* do APTT. O kit é constituído por dois reagentes diferentes, o reagente de APTT e o Cloreto de Cálcio. No entanto, optou-se por incluir no estudo apenas o reagente de APTT, uma vez que ambos são utilizados da mesma forma e na mesma quantidade durante os ensaios, tornando desnecessária a duplicação dos cálculos (51).

No equipamento ACL TOP® 750 foram estudados os reagentes:

- RecombiPlasTin (para determinação do PT) e SynthASil (para determinação do APTT)
- Reagente de Latex, suspensão de partículas de látex poliestireno revestidas com o fragmento F(ab')<sub>2</sub> do anticorpo monoclonal de rato (MA-8D3), altamente específico contra o D-Dímero presente nos FDPs, e que ao se ligar a este vai provocar uma reação visível, juntamente com albumina sérica bovina que funciona como estabilizante e evita ligações inespecíficas (58,108). O reagente Buffer contém o tampão Hepes e albumina sérica bovina que mantêm o pH estável e estabiliza a reação. Por ser um reagente que é feito propositadamente com volume a mais, não foi estudado deste projeto, sendo apenas contabilizado os valores do reagente Latex (58,109,110)
- Trombina bovina, utilizada para converter o fibrinogénio em fibrina(53);
- dRVVT Screen e o dRVVT Confirm, para o estudo do LA. Ambos possuem veneno de víbora de Russell, fosfolípidos, cálcio, polibrene, tampões, estabilizantes, corantes e conservantes. O dRVVT Screen é pobre em fosfolípidos, tornando-o sensível ao LA, já o dRVVT Confirm por ter mais fosfolípidos, não permite que o LA iniba a coagulação dependente de fosfolípidos, neutralizando o anticorpo. Sendo assim, a positividade do LA implica que o dRVVT Screen apresente um tempo de coagulação prolongado e o tempo de dRVVT Confirm esteja encurtado. O veneno de víbora de Russell ativa diretamente o fator X, na presença do cálcio, o que permite avaliar a via comum da coagulação. Neste estudo, ambos os reagentes foram analisados (36,111).

O número de resultados por frasco de reagente foi calculado pela seguinte fórmula matemática:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de Resultados/frasco de reagente} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ total de resultados}}{\text{n}^{\circ} \text{ de Frascos consumidos}}$$

O cálculo do número teórico de testes por frasco baseou-se na informação disponibilizada pelos fabricantes. Contudo, procedeu-se também à monitorização direta do número de testes indicado pelo



equipamento aquando da introdução de novos frascos. Esta análise revelou variabilidade nos valores registados, sobretudo no reagente de PT, pelo que se optou por privilegiar o valor teórico informado pela casa comercial, complementado pelas medições internas.

Para a obtenção dos indicadores de interesse, aplicaram-se as seguintes fórmulas: (112)

Número de testes teóricos/frasco de reagente =

$$\frac{((\text{Volume teórico do frasco} - \text{Volume morto do frasco}) \times \text{N}^\circ \text{ de Testes segundo Casa Comercial})}{\text{Volume teórico}}$$

Número de testes desperdiçado = N° testes totais realizados - (N° de resultados + N° de testes para QC)

$$\text{Desperdício (\%)} = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de testes desperdiçados}}{\text{N}^\circ \text{ de Testes Totais Utilizados}} \right) \times 100$$

$$\text{Rendimento ULSSA (\%)} = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de Resultados}}{\text{N}^\circ \text{ teórico de testes / frasco}} \right) \times 100$$

$$\text{Rendimento segundo casa comercial (\%)} = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de Resultados}}{\text{N}^\circ \text{ de testes segundo a casa comercial}} \right) \times 100$$

$$\text{Testes utilizados para QC (\%)} = \left( \frac{\text{N}^\circ \text{ de testes utilizados para CQ}}{\text{N}^\circ \text{ de Testes Total Utilizado}} \right) \times 100$$

### 3.1. Tratamento de Dados

Todas as informações relevantes para este estudo foram compiladas num ficheiro Microsoft Excel®, assegurando a organização e integridade dos registos. Os dados foram posteriormente tratados de forma a quantificar, a partir do número total de testes processados, três categorias distintas: a) testes válidos, correspondentes aos ensaios que originaram resultados efetivamente reportados; b) testes utilizados no Controlo de Qualidade Interno (CQI), essenciais para a validação contínua do desempenho analítico; e c) testes desperdiçados - consumos sem produção de resultado válido ou não associados a CQI, incluindo falhas técnicas, repetições não programadas ou perdas de reagente.

Com base nesta classificação, foram calculados indicadores de desempenho laboratorial, nomeadamente: percentagens de desperdício e de rendimento. Estes parâmetros possibilitaram ainda identificar, de forma detalhada, quais os reagentes associados a maior frequência de repetições de CQI e quais aqueles com maior desperdício de testes.



Para além da análise descritiva, foi efetuada uma análise comparativa entre os equipamentos ACL TOP® 550 e 750, com vista a avaliar diferenças no consumo de reagentes, na eficiência de utilização e no rendimento operacional. Os resultados obtidos na Unidade de Trombose e Hemostase da ULS Santo António foram comparados com os valores de referência fornecidos pela casa comercial Werfen, permitindo uma avaliação crítica da discrepância entre o rendimento teórico e o rendimento real dos reagentes.

#### 4. Resultados e Discussão

##### 4.1. Equipamento PFA-200®

Durante o período de estudo, foram utilizados 82 cartuchos COL/EPI e 79 cartuchos COL/ADP, resultando em 73 amostras com resultado e 2 amostras sem resultado. Das duas amostras sem resultado: uma estava coagulada e outra não tinha o volume suficiente, 800 µL, para a realização do teste (Tabela 3).

Tabela 3- Resultados do equipamento PFA-200®

Cartuchos	Nº de Cartuchos utilizados	Nº de Repetições	Amostras com resultado	Amostras sem Resultado	Nº de cartuchos desperdiçados	Desperdício (%)	Rendimento (%)
COL/EPI	82	7	73	2	9	11	89
COL/ADP	79	4			6	8	92

No Gráfico 1 é possível observar que do total de 11 repetições realizadas:

- 6 deveram-se a obstrução de fluxo - erro associado à interrupção súbita da passagem da amostra, frequentemente provocado pela presença de bolhas de ar, coágulos, hemólise ou disfunções plaquetárias, entre outras causas. Para evitar este erro é importante verificar que a amostra não tenha coágulo e pipetar devagar, tentando não criar bolhas de ar no processo de aspiração da amostra. Neste estudo, as amostras que apresentaram este tipo de erro eram na maioria de doentes com disfunção plaquetária (33).
- 2 ocorreram devido à obtenção do mesmo valor em ambos os cartuchos COL/EPI e COL/ADP. Segundo vários estudos, os valores do COL/EPI devem ser superiores aos valores do COL/ADP, quando isto não acontece é necessário proceder à repetição do teste para descartar qualquer erro durante o procedimento (43,113).



- 2 deveram-se à obtenção de resultados significativamente discrepantes face aos valores de referência.
- 1 repetição foi necessária em virtude do tempo máximo de oclusão ter sido excedido (superior a 300 segundos). Isto pode acontecer devido a uma diminuição do hematócrito, contagem de plaquetas ou número de leucócitos, toma de antiagregantes plaquetários, como por exemplo Aspirina, ou até Doença de von Willebrand (DvW). É essencial consultar o histórico do doente antes de repetir o teste para perceber se é algo recorrente e associado a alguma patologia, de modo a evitar repetições desnecessárias e consequentemente o desperdício de cartuchos (42).

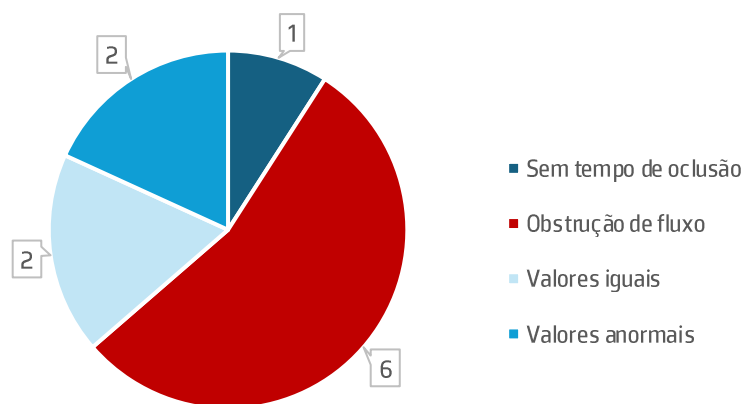


Gráfico 1- Número de repetições e motivo

É fundamental que os tubos destinados à avaliação da função plaquetária não sejam submetidos a centrifugação, uma vez que este processo pode induzir a ativação da cascata de coagulação e desencadear agregação plaquetária antes da análise. Dado que este tipo de ensaio exige que as plaquetas permaneçam no seu estado fisiológico basal, não agregado, a centrifugação comprometeria a validade dos resultados obtidos (114).

O cartucho que exigiu maior número de repetições foi o COL/EPI, refletindo uma maior suscetibilidade a erros ou interferências. Em contrapartida, o cartucho COL/ADP apresentou menor percentagem de desperdício e, consequentemente, maior taxa de rendimento, quando comparado com o COL/EPI.



## 4.2. Equipamento ACL TOP® 550

A Tabela 4 apresenta a distribuição dos testes realizados no equipamento ACL TOP® 550 para os reagentes APTT e PT, incluindo o número total de testes executados, o número total de resultados obtidos e a média desse valor por frasco de reagente, e o número de testes consumidos no controlo de qualidade.

Tabela 4- Resultados do equipamento ACL TOP® 550

Reagentes	Nº de testes total utilizados	Nº de Resultados	Nº de Resultados/Frasco ULSSA	Nº de testes para CQ
APTT	1438	1340	168	84
PT	1599	1500	167	90

Verificou-se, nos equipamentos ACL TOP® 550 e 750, uma variabilidade significativa no número de testes teóricos que cada frasco de reagente novo de PT aquando da sua abertura, (Anexo 2).

Com base nesses valores, procedeu-se ao cálculo para determinar o número de testes teóricos por frasco de reagente e, subsequentemente, a percentagem de rendimento. Os resultados obtidos demonstraram uma discrepância relativamente aos valores esperados. Com base na média, cada frasco de reagente permitiria a realização de aproximadamente 96 testes, número consideravelmente inferior aos 167 testes efetivamente registados e ao valor indicado pela casa comercial, que referencia cerca de 200 testes por frasco. A percentagem de rendimento resultou num valor de 172%, indicativo de algum tipo de erro.

Várias hipóteses foram consideradas para justificar esta discrepância:

- Erro na medição do volume morto, parâmetro utilizado no cálculo do número de testes teóricos por frasco. Esta possibilidade foi, no entanto, considerada pouco provável, uma vez que a medição foi repetida várias vezes, obtendo-se sempre valores consistentes;
- Falha no registo da reconstituição de novos frascos, hipótese considerada também pouco plausível, dado que a abertura de novos frascos era regularmente registada, com uma frequência média de dois dias, correspondendo ao tempo habitual de utilização;
- Configuração incorreta do equipamento, podendo estar a medir um volume de reagente errado;
- Incorreta quantificação do equipamento da quantidade de testes por frasco, uma vez que, nas várias medições apresentou valores diferentes.



Após exclusão sistemática das hipóteses menos prováveis, concluiu-se que a origem mais plausível do erro estaria relacionada com a quantificação incorreta do número de testes pelo equipamento, observando-se que este fenómeno ocorre exclusivamente no reagente PT. A situação foi comunicada ao fornecedor, com o intuito de proceder à investigação e eventual correção do problema identificado.

Face à discrepância identificada, optou-se por utilizar o valor fornecido pela casa comercial, em detrimento do valor reportado pelo equipamento. Para o cálculo final do número de testes que teoricamente cada frasco produz, foi ainda subtraído o volume morto estimado, de forma que o valor obtido seja o mais próximo da realidade possível (Tabela 5 e Gráfico 2).

Tabela 5- Registos efetuados e resultado do cálculo de testes teóricos do equipamento ACL TOP® 550

Reagentes	Vol. Morto (média ml)	Nº frascos utilizados	Volume teórico por frasco (ml)	Nº testes/frasco ULS SA	Nº testes /frasco Casa Comercial
APTT	1,35	8	10	173	200
PT	1,4	9	20	186	200

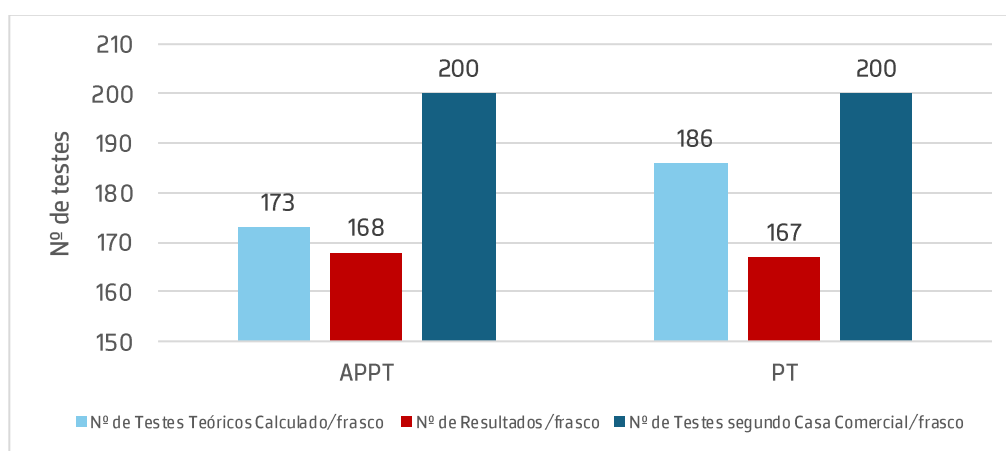


Gráfico 2- Distribuição do número de testes teóricos calculados pela ULSSA e obtidos pela casa comercial

Observa-se no Gráfico 2, que o número de testes indicado pela casa comercial para cada frasco de reagente revelou-se superior tanto ao número de testes teóricos que foi calculado (subtraindo o volume morto), como ao número de testes efetivamente obtido no laboratório. O valor apresentado pela casa comercial não contempla o volume morto, os testes realizados nos controlos de qualidade e as perdas associadas a eventuais desperdícios, motivo pelo qual não reflete totalmente a realidade operacional. Em ambos os reagentes, o número de testes teórico calculado foi superior ao número final de resultados emitidos. Esta diferença é justificada pelo facto de que o cálculo teórico considera apenas



o volume morto residual presente após a notificação de frasco vazio pelo equipamento. Enquanto os resultados efetivos são também influenciados pelo consumo de testes em controlo de qualidade e por desperdícios inevitáveis no processo, sendo, por isso, expectável a obtenção de um número inferior de resultados em relação à estimativa inicial.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores de percentagem de desperdício, de rendimento e o número de testes utilizados para CQI.

Tabela 6– Resultados calculados referentes ao equipamento ACL TOP® 550

Reagentes	Desperdiço n (%)	Rendimento por frasco ULSSA (%)	Rendimento por frasco Casa Comercial (%)	Testes utilizados para CQI (%)
APTT	14 (0,97)	97	84	5,8
PT	9 (0,56)	90	83	5,6

Nos dois reagentes utilizados, a percentagem de desperdício é inferior a 1%, sendo ligeiramente maior no APTT.

A percentagem de testes utilizados para o CQI foi de aproximadamente 6% para ambos os reagentes. No Laboratório de Trombose e Hemostase, com funcionamento diário limitado a 7h30, os controlos de qualidade são tipicamente realizados uma única vez pela manhã, exceto na introdução de novos frascos de reagente, quando se torna necessário repetir os controlos. Por outro lado, no PASU, que opera 24 horas por dia, os controlos são executados com maior frequência, resultando numa percentagem de consumo de reagentes para CQI significativamente diferente. Este contraste evidencia o impacto da frequência operacional e da programação de turnos sobre a utilização de reagentes e a gestão do controlo de qualidade. No Gráfico 3 observa-se que a percentagem de rendimento do laboratório é diferente da casa comercial.

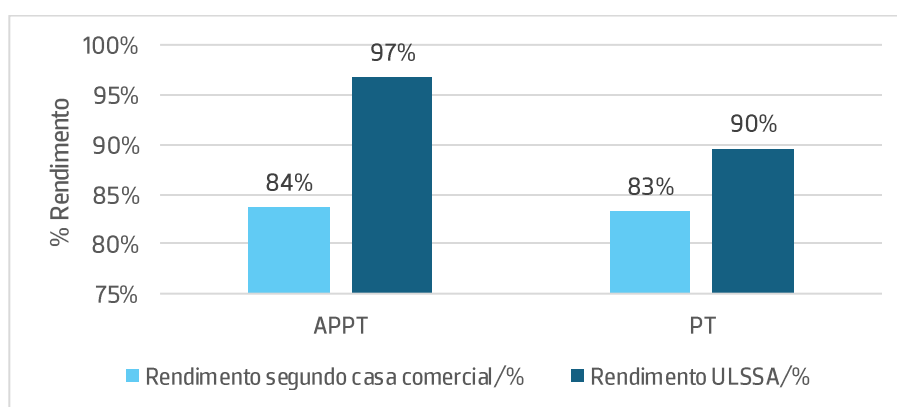


Gráfico 3– Percentagem de Rendimento obtida no laboratório em comparação com a da Casa Comercial



Esta discrepância resulta das diferenças metodológicas na determinação da percentagem de utilização. No contexto laboratorial, esta percentagem foi calculada com base no número teórico de testes, estimado internamente e incorporando perdas inevitáveis do processo, tais como volume morto, desperdícios, repetições e testes utilizados no controlo de qualidade. Em contraste, a percentagem de rendimento reportada pelo fabricante assenta num valor de referência mais elevado, que não considera qualquer perda operacional. Consequentemente, ao dividir o número de testes efetivamente realizados por um denominador superior, o cálculo do fabricante produz uma percentagem de rendimento inferior àquela observada na prática laboratorial.

### 4.3. Equipamento ACL TOP® 750

A Tabela 7 e 8 apresenta a distribuição dos testes realizados e o cálculo de testes teóricos no equipamento ACL TOP® 750.

Tabela 7- Resultados extraídos do equipamento ACL TOP® 750

Reagentes	Total de testes utilizados (n)	Total de resultados (n)	Total de resultados por frasco (n)	Testes utilizados para a CQ (n)
APTT	1867	1670	152	124
PT	1936	1792	163	113
DD	170	91	15	56
Fibrinogénio	264	186	21	70
dRVVT C	213	182	15	29
dRVVT S	212	182	15	28

Tabela 8- Registos e resultado do cálculo de testes teóricos do equipamento ACL TOP® 750

Reagentes	Volume Morto (média - mL)	Nº de frascos (n)	Volume / frasco (mL)	Testes /frasco Calculado (n)	Testes/frasco Casa Comercial (n)
APTT	1,35	11	10	173	200
PT	1,4	11	20	186	200
DD	1,15	6	4	32	44
Fibrinogénio	0,625	9	2	28	40
dRVVT C	0,675	12	2	18	27
dRVVT S	0,675	12	2	18	27



No Gráfico 4, observa-se que o número de testes por frasco de reagente indicado pela casa comercial é superior ao número dos resultados obtidos no laboratório.

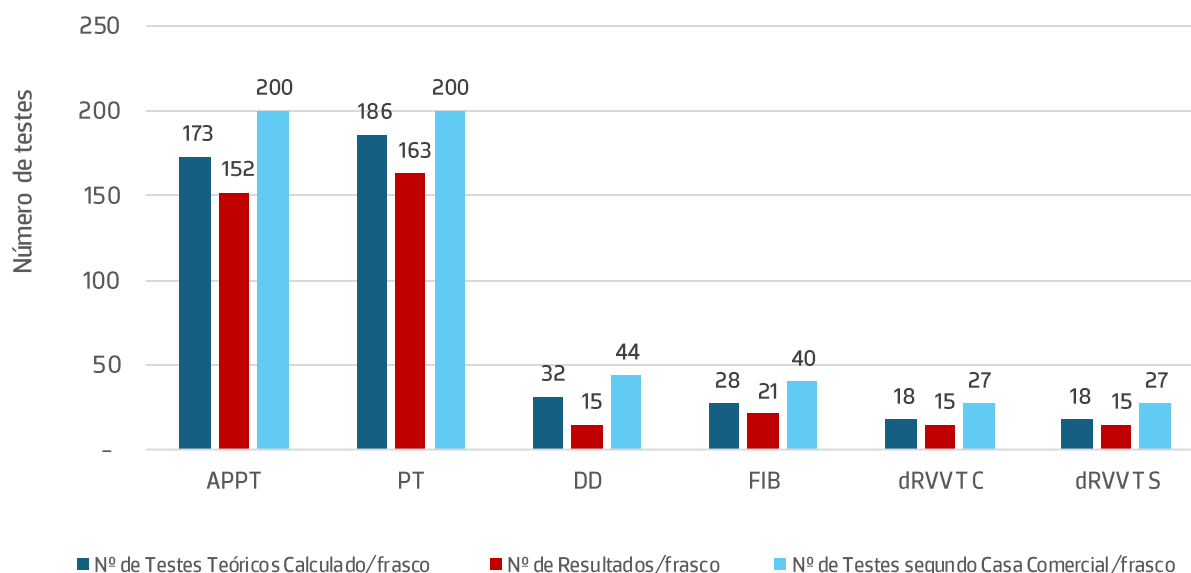


Gráfico 4– Distribuição da quantidade de testes teóricos calculados pelo laboratório e obtidos pela casa comercial

Em todos os reagentes, o número de resultados emitidos por frasco de reagente foi inferior ao número teórico de testes calculado, uma vez que no cálculo realizado só foi considerado o volume morto e não os testes desperdiçados e gastos no CQ, enquanto no número de resultados todos esses fatores já estão devidamente incluídos.

Os DD apresentam a maior diferença entre os dois valores e uma percentagem de desperdício considerável, 14%, sendo assim normal que haja menos resultados emitidos do que o esperado. A percentagem de desperdício dos outros reagentes, juntamente com os demais parâmetros, estão ilustrados na Tabela 9.

Tabela 9– Resultados referentes ao equipamento ACL TOP® 750

Reagentes	Desperdício n (%)	Rendimento por frasco ULSSA (%)	Rendimento por frasco Casa Comercial (%)	Testes utilizados para CQI (%)
APTT	73 (4)	88	76	7
PT	31 (2)	88	81	6
DD	23 (14)	48	34	33
Fibrinogénio	8 (3)	75	52	27
dRVVTC	2 (1)	86	62	14
dRVVTS	2 (1)	86	62	13



Os reagentes utilizados para o PT e APTT apresentam o maior rendimento, possivelmente devido ao facto de serem os mais frequentemente utilizados, sendo geralmente consumidos na totalidade.

Os reagentes de DD exibem a maior percentagem de desperdício e de testes utilizados para CQ, uma vez que uma parte significativa do reagente é consumida em controlos e repetições, resultando na menor percentagem de rendimento entre os reagentes analisados.

O reagente do fibrinogénio apresenta a segunda menor percentagem de rendimento não devido ao desperdício, que é relativamente baixo (3%), mas pelo consumo elevado nos controlos de qualidade, que corresponde a aproximadamente 27% do reagente.

Os reagentes utilizados para o Anticoagulante Lúpico apresentam a menor percentagem de desperdício. Contudo, registam uma proporção considerável de testes destinados ao CQ, uma vez que, devido à baixa estabilidade, os controlos são frequentemente repetidos. Apesar disso, apresentam uma percentagem de rendimento relativamente elevada (86%), resultado da estratégia laboratorial de reconstituir o reagente apenas às segundas e quartas ou quintas-feiras, conforme a necessidade, de modo a otimizar a utilização e minimizar o desperdício associado à sua limitada estabilidade.

A percentagem de rendimento para todos os reagentes obtida na unidade da ULSSA é superior à reportada pela casa comercial. Esta diferença deve-se ao facto de, na unidade, o cálculo se basear no número teórico de testes que um frasco pode fornecer, enquanto o fabricante calcula o rendimento a partir de um valor de referência mais elevado, que não contempla perdas operacionais.

Para determinados reagentes, como a quantificação do Fibrinogénio e dos DD, os controlos são frequentemente repetidos, consumindo uma quantidade significativa de reagente e testes de controlo. Esta situação resulta da baixa estabilidade dos reagentes – 3 dias para o fibrinogénio e 7 dias para os DD quando dentro do aparelho – assim como dos controlos (53,58). Nestes casos, recomenda-se reconstituir novos controlos, de forma a evitar o consumo desnecessário de reagente. Sempre que se identifique que o erro é atribuível ao reagente, este deve ser substituído para minimizar o desperdício.

Para preservar a estabilidade dos controlos, é fundamental que, após a sua utilização, sejam imediatamente retirados do equipamento e armazenados no frigorífico.

Uma possibilidade para melhorar o rendimento dos DD, seria adotar a mesma estratégia usada para o LA, e começar a realizar os testes apenas em certos dias da semana. Esta abordagem permite reduzir o desperdício, pois evita que os controlos e reagentes sejam consumidos em dias sem amostras requisitadas. Além disso, a permanência prolongada do reagente no equipamento diminui a sua



estabilidade, dado que a temperatura no equipamento é superior à do frigorífico. Segundo a bula, a estabilidade do reagente é de 7 dias a 15 °C e 1 mês a 2–8 °C (40).

O Gráfico 5 permite observar, em média, a relação entre a fração de reagente consumido e a fração de reagente não consumido.

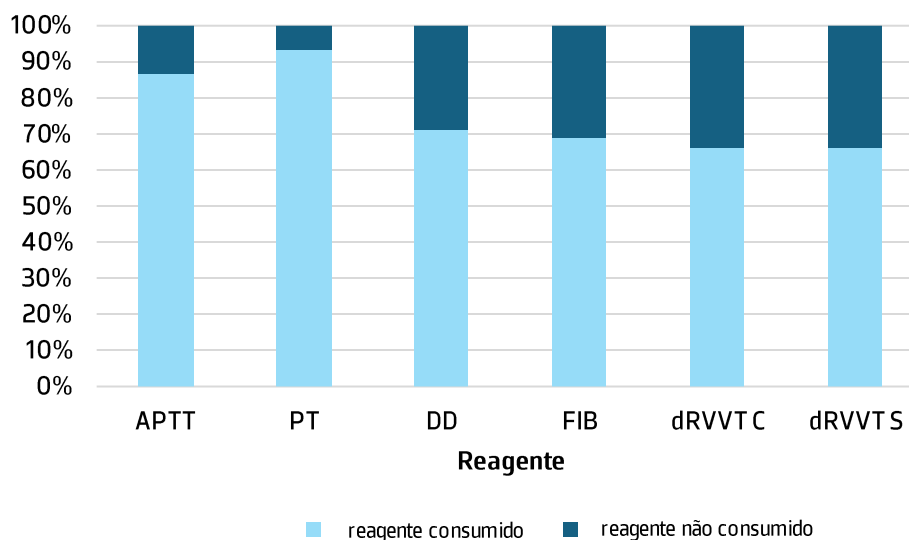


Gráfico 5 - Distribuição da fração de reagente consumido vs não consumida

A Tabela 10 apresenta o volume morto e o volume útil correspondente a cada reagente.

Tabela 10- Quantidade de volume morto e volume útil de cada reagente

Reagente	APTT	PT	DD	FIB	dRVVT C	dRVVT S
Média do Volume Morto/mL	1,35	1,4	1,15	0,625	0,675	0,675
Volume Útil/mL	8,65	18,6	2,85	1,375	1,325	1,325

O volume morto dos reagentes DD, Fib, dRVVT C e dRVVT S corresponde aproximadamente 30% do volume total, deixando cerca de 70% disponíveis para utilização efetiva nos ensaios. Contudo, as possibilidades de intervenção são limitadas, considerando que o suposto consumo total de reagente é determinado pelo equipamento com base no volume e no tipo de frasco de reagente utilizado.

Uma potencial estratégia para reduzir este desperdício seria transferir o volume morto para um frasco de menor capacidade. Esta abordagem apresenta, porém, diversas limitações: o laboratório não dispõe de frascos compatíveis, e qualquer alteração na geometria do frasco poderia comprometer o desempenho do sistema de aspiração do equipamento, uma vez que o código que identifica o tipo de



reagente também determina as especificações físicas do frasco esperado pelo aparelho. Na ausência de soluções imediatas para este problema, a redução do desperdício deve focar-se na minimização de repetições de testes e controlos, assegurando que as amostras se encontram em condições adequadas para processamento, tanto em termos de volume como de integridade pré-analítica. Paralelamente, recomenda-se otimizar a estabilidade dos reagentes, mantendo-os sob condições de armazenamento conformes às normas do fabricante, de modo a prolongar a sua validade e maximizar o rendimento operacional.

#### 4.4. Análise comparativa dos equipamentos ACL TOP® 550 e 750

A análise comparativa entre os equipamentos ACL TOP® 550 e 750 permitiu avaliar de forma objetiva os indicadores de desempenho laboratorial, nomeadamente a percentagem de desperdício, de rendimento e a proporção de testes utilizados no controlo de qualidade, constituindo parâmetros fundamentais para a interpretação da eficiência global dos sistemas (Figura 6).

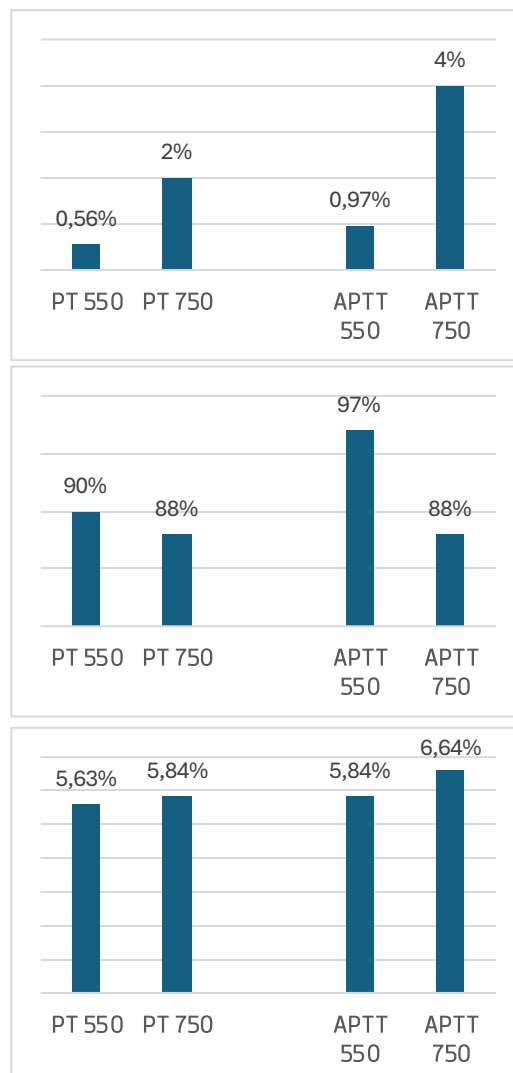


Figura 6- Análise comparativa do desperdício (A), rendimento (B) e do número de testes utilizados no CQI (C)



A percentagem de desperdício no ACL TOP® 750 excede duas vezes a percentagem do ACL TOP® 550. Esta diferença deve-se ao facto de que, no modelo 750, são realizados testes adicionais, como os de fatores de coagulação, que também consomem estes reagentes, mas cujos resultados não estão incluídos nas análises de PT e APTT. Consequentemente, estes ensaios, embora consumam reagente, não devem ser considerados desperdício, uma vez que são essenciais para a execução dos respetivos parâmetros. De forma semelhante, a percentagem de rendimento do ACL TOP® 550 apresenta valores ligeiramente superiores aos do ACL TOP® 750, refletindo o mesmo efeito.

No que diz respeito aos testes utilizados para Controlo de Qualidade Interno, ambos os equipamentos consomem aproximadamente a mesma quantidade. No Laboratório de Trombose e Hemostase, os CQI são normalmente realizados apenas uma vez por dia, no início do turno, dado que o funcionamento diário se limita a cerca de 7 horas. A exceção ocorre quando um reagente é totalmente consumido e um novo frasco é inserido no equipamento, momento em que os controlos são novamente executados.



## 5. Conclusão

O estudo de caso realizado na Unidade de Trombose e Hemostase permitiu concluir que o rendimento dos equipamentos ACL TOP® 550, ACL TOP® 750 e PFA-200® é globalmente satisfatório, com percentagens de desperdício relativamente baixas.

Foram identificadas oportunidades de otimização, particularmente relacionadas com a estabilidade de alguns reagentes e a gestão dos controlos de qualidade.

A análise dos resultados permitiu ainda constatar uma diferença expressiva entre o número de testes estimado pelo fabricante e o número de resultados efetivamente obtidos. Esta informação constitui um contributo relevante para a gestão futura de recursos e aquisição de reagentes, permitindo um planeamento mais ajustado às necessidades reais do laboratório. Embora a análise dos reagentes menos utilizados no equipamento ACL TOP® 750 não ter sido concluída, os dados preliminares sugerem um desperdício mais elevado comparativamente aos reagentes de rotina, o que é expectável dado o seu uso menos frequente. O mesmo se aplica aos reagentes destinados à quantificação dos fatores de coagulação, serem congelados após a utilização e apenas podem ser descongelados uma vez. Em situações de urgência, o reagente pode ser utilizado em apenas duas ocasiões, traduzindo-se num desperdício significativo. A preparação de alíquotas não é viável devido ao reduzido volume disponível (1 mL), e seria inaceitável comprometer o diagnóstico ou o tratamento do doente com o objetivo de otimizar o rendimento do reagente.

Do ponto de vista ético, este trabalho reflete ainda a responsabilidade social associada à gestão racional dos recursos laboratoriais, promovendo a sustentabilidade através da minimização de desperdícios, sem comprometer a qualidade analítica nem a fiabilidade diagnóstica.

Por fim, recomenda-se a realização de um estudo semelhante com o equipamento CN-3000, com vista à identificação de estratégias que minimizem o desperdício e otimizem a utilização dos reagentes.



## Referências Bibliográficas

1. Unidade Local de Saúde de Santo António. Apresentação [Internet]. [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://museuchporto.ulssa.pt/vOF0BOA/hospital-de-santo-antonio>
2. Museu do centro Hospitalar do Porto. Hospital de Santo António [Internet]. [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://museuchporto.ulssa.pt/vOF0BOA/hospital-de-santo-antonio>
3. Unidade Local de Saúde de Santo António. Memória e Património Cultural [Internet]. [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://www.ulssa.pt/vOBOE/historia>
4. Unidade Local de Saúde de Santo António. Serviço de Imunohemoterapia [Internet]. [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://www.ulssa.pt/vOCOJODOG/servico-de-imunohemoterapia>
5. Unidade Local de Saúde de Santo António. Centro de Referência de Coagulopatias Congénitas [Internet]. [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://www.ulssa.pt/vOIOBOB/centro-de-doencas-hereditarias-do-metabolismo>
6. Unidade Local de Saúde de Santo António. Unidade de Trombose e Hemostase [Internet]. [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://www.ulssa.pt/vOCOJODOR/unidade-de-trombose-e-hemostase>
7. Mann KG, Whelihan MF, Butenas S, Orfeo T. Citrate anticoagulation and the dynamics of thrombin generation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007 Oct;5(10):2055–61.
8. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation testing in the core laboratory. Vol. 48, *Lab Medicine*. Oxford University Press; 2017. p. 295–313.
9. Hao Z, Jin DY, Stafford DW, Tie JK. Vitamin K-dependent carboxylation of coagulation factors: Insights from a cell-based functional study. *Haematologica*. 2020 Aug 1;105(8):2164–73.
10. Rosenberg AF, Zumberg M, Taylor L, Leclair A, Harris N. The use of anti-Xa assay to monitor intravenous unfractionated heparin therapy. Vol. 23, *Journal of Pharmacy Practice*. SAGE Publications Inc.; 2010. p. 210–6.
11. Söderström AC, Nybo M, Nielsen C, Vinholt PJ. The effect of centrifugation speed and time on pre-analytical platelet activation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2016 Dec 1;54(12):1913–20.
12. Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen A, Lippi G, Mackie I, et al. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol*. 2021 Dec 27;43(6):1272–83.
13. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):327–58.



14. Saad J, Asuka E, Schoenberger L. Physiology, Platelet Activation. StatPearls Publishing; 2025.
15. Kumar Vinay, Abbas AK., Aster JC., Perkins JA. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9th ed. Elsevier/Saunders; 2015. 1391 p.
16. van Herrewegen F, Meijers JCM, Peters M, van Ommen CH. Clinical practice. Eur J Pediatr. 2012 Feb 17;171(2):207–14.
17. Mehic D, Colling M, Pabinger I, Gebhart J. Natural anticoagulants: A missing link in mild to moderate bleeding tendencies. Vol. 27, Haemophilia. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 701–9.
18. Risman RA, Kirby NC, Bannish BE, Hudson NE, Tutwiler V. Fibrinolysis: an illustrated review. Vol. 7, Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. Elsevier B.V.; 2023.
19. May JE, Wolberg AS, Lim MY. Disorders of Fibrinogen and Fibrinolysis. Hematol Oncol Clin North Am. 2021 Dec;35(6):1197–217.
20. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Rev. 2003 Sep;17:S1–5.
21. Kearney KJ, Butler J, Posada OM, Wilson C, Heal S, Ali M, et al. Kallikrein directly interacts with and activates Factor IX, resulting in thrombin generation and fibrin formation independent of Factor XI. 2020; Available from: <https://www.pnas.org/lookup/suppl/>
22. Mohammed BM, Sun M fu, Cheng Q, Litvak M, McCrae KR, Emsley J, et al. High molecular weight kininogen interactions with the homologs prekallikrein and factor XI: importance to surface-induced coagulation. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2024 Jan 1;22(1):225–37.
23. Park S, Park JK. Back to basics: the coagulation pathway. Blood Res. 2024 Dec 28;59(1):35.
24. Pires CSC. Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas. [Coimbra]: Universidade de Coimbra; 2015.
25. Milos M, Herak D, Kuric L, Horvat I, Zadro R. Evaluation and performance characteristics of the coagulation system: ACL TOP analyzer – HemosIL reagents. Int J Lab Hematol. 2009 Feb 11;31(1):26–35.
26. Sysmex. CN-3000/CN-6000 [Internet]. [cited 2025 Sep 22]. Available from: <https://www.sysmex-ap.com/product/cn3000-cn-6000/>
27. Aesku.Diagnostics. AESKULISA® Cardiolipin-GM [Internet]. Wendelsheim; 2025 Jan. Available from: [www.aesku.com](http://www.aesku.com)
28. Aesku.Diagnostics. AESKULISA®  $\beta$ 2-Glyco-GM [Internet]. Wendelsheim; 2024 Dec. Available from: [www.aesku.com](http://www.aesku.com)



29. Gritsch H, Stimpfl M, Turecek P. Von Willebrand Factor Multimer Analysis by Low Resolution SDS-Agarose Gel Electrophoresis. *Bio Protoc.* 2022;12(16).
30. Instrumentation Laboratory. HemosIL® AcuStar ADAMTS13 Activity. 2019 Jul.
31. Instrumentation Laboratory. HemosIL® AcuStar Von Willebrand Factor Collagen Binding Activity. 2016 May.
32. Koltai K, Kesmarky G, Feher G, Tibold A, Toth K. Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 2017 Aug 18;18(8):1803.
33. Kornya MR, Abrams-Ogg ACG, Blois SL, Wood RD. Platelet function analyzer-200 closure curve analysis and assessment of flow-obstructed samples. *Vet Clin Pathol.* 2023 Dec 1;52(4):576–82.
34. Instrumentation Laboratory. Introducing The most advanced systems in Hemostasis testing.
35. Straits Scientific Sdn Bhd. Instrumentation Laboratory ACL TOP 550 CTS Operation Quick Guide [Internet]. 2020 Jun [cited 2025 Sep 30]. Available from: [https://pt.scribd.com/document/770482523/ACL-TOP-550-Operation-Quick-Guide?utm\\_source=](https://pt.scribd.com/document/770482523/ACL-TOP-550-Operation-Quick-Guide?utm_source=)
36. Instrumentation Laboratory. HemosIL® ACL TOP 50 dRVVT Screen/dRVVT Confirm. 2019 Aug.
37. Smith LJ. Laboratory Diagnosis of the Lupus Anticoagulant. *American Society for Clinical Laboratory Science.* 2017 Jan 1;30(1):7–14.
38. Instrumentation Laboratory. HemosIL® Protein C. 2017 Jun.
39. Gupta A, Patibandla S. Protein C Deficiency. StatPearls Publishing; 2025.
40. Instrumentation Laboratory. HemosIL™ Free Protein S. 2004 Apr.
41. Instrumentation Laboratory. HemosIL™ Liquid Antithrombin. 2007 Nov.
42. Favaloro EJ. Clinical utility of closure times using the platelet function analyzer-100/200. *Am J Hematol.* 2017 Apr 1;92(4):398–404.
43. Favaloro EJ, Pasalic L, Lippi G. Towards 50 years of platelet function analyser (PFA) testing. Vol. 61, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* De Gruyter Open Ltd; 2023. p. 851–60.
44. Practical-Haemostasis.com [Internet]. 2022 [cited 2025 Sep 18]. Platelet Function Testing Light Transmission Aggregometry [LTA]. Available from: [https://practical-haemostasis.com/Platelets/platelet\\_function\\_testing\\_lta.html](https://practical-haemostasis.com/Platelets/platelet_function_testing_lta.html)
45. Wang Z, Huang J, Huang J, Yu B, Pu K, Xu FJ. Chemiluminescence: From mechanism to applications in biological imaging and therapy. Vol. 2, *Aggregate.* John Wiley and Sons Inc; 2021.



46. Dorgalaleh A, Favalaro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of Prothrombin Time/International Normalized Ratio (PT/INR). Vol. 43, International Journal of Laboratory Hematology. Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 21–8.
47. Filho MM. Anticoagulation Therapy with Warfarin: A Reality of Brazilian Public Health that Lacks Structure for Better Control. Vol. 119, Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Sociedade Brasileira de Cardiologia; 2022. p. 370–1.
48. Buliarca A, Horhat A, Mocan T, Craciun R, Procopet B, Sparchez Z. Viscoelastic tests in liver disease: where do we stand now? Vol. 27, World Journal of Gastroenterology. Baishideng Publishing Group Inc; 2021. p. 3290–302.
49. Yang R, Zubair M, Moosavi L. Prothrombin Time. StatPearls Publishing; 2024.
50. Rountree KM, Yaker Z, Lopez PP. Partial Thromboplastin Time. StatPearls Publishing; 2025.
51. Instrumentation Laboratory. HemosIL ® SynthAsil. 2006 Jun.
52. Kaur J, Patel P, Jain A. Fibrinogen. StatPearls Publishing ; 2025.
53. Instrumentation Laboratory. HemosIL ® Fibrinogen–C XL. 2017 Jun.
54. Alemayehu E, Mohammed O, Belete MA, Mulatie Z, Debash H, Gedefie A, et al. Association of prothrombin time, thrombin time and activated partial thromboplastin time levels with preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. BMC Pregnancy Childbirth. 2024 Dec 1;24(1).
55. Apipongrat D, Police P, Lamool R, Butthep P, Chantkran W. Validation of high concentrated thrombin time assay for unfractionated heparin monitoring. J Clin Lab Anal. 2022 Oct 1;36(10).
56. Karapetian H. Reptilase Time (RT). In: M. Walker J, editor. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2013. p. 273–7.
57. Killeen RB, Kok SJ. D-Dimer Test. StatPearls Publishing; 2025.
58. Instrumentation Laboratory. HemosIL ® D-Dimer HS 500. 2018 Apr.
59. Legnani C, Cini M, Scarvelis D, Toulon P, Wu JR, Palareti G. Multicenter evaluation of a new quantitative highly sensitive D-dimer assay, the Hemosil® D-dimer HS 500, in patients with clinically suspected venous thromboembolism. Thromb Res. 2010 May;125(5):398–401.
60. Helms J, Iba T, Connors JM, Gando S, Levi M, Mezzani F, et al. How to manage coagulopathies in critically ill patients. Vol. 49, Intensive Care Medicine. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023. p. 273–90.
61. Almomani MH, Mangla A. Bernard–Soulier Syndrome. StatPearls Publishing; 2025.



62. Nichols WL, Kaese SE, Gastineau DA, Otteman LA, Bowie EJW. Bernard–Soulier Syndrome: Whole Blood Diagnostic Assays of Platelets. *Mayo Clin Proc.* 1989 May;64(5):522–30.
63. Krause KA, Graham BC. Glanzmann Thrombasthenia. StatPearls Publishing; 2025.
64. Botero JP, Lee K, Branchford BR, Bray PF, Freson K, Lambert MP, et al. Glanzmann thrombasthenia: Genetic basis and clinical correlates. Vol. 105, *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation; 2020. p. 888–94.
65. Weyand AC, Flood VH. Von Willebrand Disease: Current Status of Diagnosis and Management. Vol. 35, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2021. p. 1085–101.
66. Seidizadeh O, Mollica L, Zambarbieri S, Baronciani L, Cairo A, Colpani P, et al. Type 2M/2A von Willebrand disease: a shared phenotype between type 2M and 2A. *Blood Adv.* 2024 Apr 9;8(7):1726–36.
67. Legan ER, Liu Y, Arce NA, Parker ET, Lollar P, Zhang XF, et al. Type 2B von Willebrand disease mutations differentially perturb autoinhibition of the A1 domain [Internet]. Available from: [http://ashpublications.org/blood/article-pdf/141/10/1221/2086616/blood\\_bld-2022-017239-main.pdf](http://ashpublications.org/blood/article-pdf/141/10/1221/2086616/blood_bld-2022-017239-main.pdf)
68. Seidizadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Von Willebrand disease type 2N: An update. Vol. 19, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. Blackwell Publishing Ltd; 2021. p. 909–16.
69. James AH, Eikenboom J, Federici AB. State of the art: von Willebrand disease. *Haemophilia.* 2016 Jul 13;22(S5):54–9.
70. Favaloro EJ. The Role of the von Willebrand Factor Collagen–Binding Assay (VWF:CB) in the Diagnosis and Treatment of von Willebrand Disease (VWD) and Way Beyond: A Comprehensive 36–Year History. *Semin Thromb Hemost.* 2024 Feb 20;50(01):043–80.
71. Sabih A, Babiker HM. Von Willebrand Disease. StatPearls Publishing; 2025.
72. Sebia [Internet]. 2021 [cited 2025 Sep 18]. Eletroforese em Gel. Available from: <https://www.sebia.com/pt-pt/technologies/eletroforese-em-gel/>
73. Lillicrap D. Ciencia Básica, Diagnóstico y Tratamiento Médico de la enfermedad de von Willebrand [Internet]. Ontario; 2008 Apr. Available from: [www.wfh.org](http://www.wfh.org)
74. Salen P, Babiker HM. Hemophilia A. StatPearls Publishing; 2025.
75. Malec L, Matino D. Targeting higher factor VIII levels for prophylaxis in haemophilia A: a narrative review. Vol. 29, *Haemophilia*. John Wiley and Sons Inc; 2023. p. 1419–29.



76. Favaloro EJ. Coagulation mixing studies: Utility, algorithmic strategies and limitations for lupus anticoagulant testing or follow up of abnormal coagulation tests. *Am J Hematol.* 2020 Jan 1;95(1):117–28.
77. Alshaikhli A, Killeen RB, Rokkam VR. Hemophilia B. StatPearls Publishing; 2025.
78. Haider MZ, Anwer F. Acquired Hemophilia. StatPearls Publishing; 2025.
79. García-Chávez J, Majluf-Cruz A. Acquired hemophilia. Vol. 156, *Gaceta Medica de Mexico. Academia Nacional de Medicina*; 2020. p. 69–75.
80. Tiede A, Collins P, Knoebl P, Teitel J, Kessler C, Shima M, et al. International recommendations on the diagnosis hemophilia and a treatment of acquired. *Haematologica.* 2020 Jul 1;105(7):1791–801.
81. Gupta A, Tun AM, Gupta K, Tuma F. Protein S Deficiency. StatPearls Publishing; 2025.
82. Hart C, Rott H, Heimerl S, Linnemann B. Management of Antithrombin Deficiency in Pregnancy. Vol. 42, *Hamostaseologie. Georg Thieme Verlag*; 2022. p. 320–9.
83. Tektonidou MG, Andreoli L, Limper M, Amoura Z, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, et al. EULAR recommendations for the management of antiphospholipid syndrome in adults. *Ann Rheum Dis.* 2019 Oct 1;78(10):1296–304.
84. Hubben A, Mccrae KR. How to diagnose and manage antiphospholipid syndrome.
85. McDonnell T, Wincup C, Buchholz I, Pericleous C, Giles I, Ripoll V, et al. The role of beta-2-glycoprotein I in health and disease associating structure with function: More than just APS. *Blood Rev.* 2020 Jan;39:100610.
86. Molinari AC, Martini T, Banov L, Ierardi A, Leotta M, Strangio A, et al. Lupus Anticoagulant Detection under the Magnifying Glass. Vol. 12, *Journal of Clinical Medicine. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*; 2023.
87. Arcilla CK, Zubair M. Antiphospholipid Antibody Testing. StatPearls Publishing; 2025.
88. Bustamante JG, Goyal A, Rout P, Singhal M. Antiphospholipid Syndrome. StatPearls Publishing; 2025.
89. Stanley M, Killeen RB, Michalski JM. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura. StatPearls Publishing; 2025.
90. Boender J, Nederlof A, Meijer K, Mauser-Bunschoten EP, Crossen MH, Fijnvandraat K, et al. ADAMTS-13 and bleeding phenotype in von Willebrand disease. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020 Nov 1;4(8):1331–9.



91. Williams–Norwood T, Ciszak AG, Caswell M, Ingle C, Milner B, Lacey C, et al. Design and implementation of an anti-factor Xa Heparin monitoring protocol. *AACN Adv Crit Care*. 2020 Jun 1;31(2):129–37.
92. Willekens G, Studt JD, Mendez A, Alberio L, Fontana P, Wuillemin WA, et al. A universal anti-Xa assay for rivaroxaban, apixaban, and edoxaban measurements: method validation, diagnostic accuracy and external validation. *Br J Haematol*. 2021 Jun;193(6):1203–12.
93. Instrumentation Laboratory. HemosIL® Liquid Anti-Xa. 2021 Feb.
94. Chaves CD. Controle de qualidade no laboratório de análises clínicas. *J Bras Patol Med Lab*. 2010 Oct;46(5):352–352.
95. Plebani M. Charting the course of medical laboratories in a changing environment. *Clinica Chimica Acta*. 2002 May;319(2):87–100.
96. Saúde PC. Diário da República, 2.ª série. 1000.
97. Silva AM da, Melo RM de. Uma abordagem multicritério para a seleção de serviços de consultoria e certificação de Sistemas de Gestão da Qualidade. *Gestão & Produção*. 2017 Sep 28;25(1):160–74.
98. Nichols JH. Laboratory Quality Control Based on Risk Management. *Ann Saudi Med*. 2011 May;31(3):223–8.
99. Gruber L, Hausch A, Mueller T. Internal Quality Controls in the Medical Laboratory: A Narrative Review of the Basic Principles of an Appropriate Quality Control Plan. *Diagnostics*. 2024 Oct 5;14(19):2223.
100. Libeer JC. Role of external quality assurance schemes in assessing and improving quality in medical laboratories. *Clinica Chimica Acta*. 2001 Jul;309(2):173–7.
101. Plebani M. External quality assessment programs: Past, present and future. *Jugoslovenska medicinska biohemija*. 2005;24(3):201–6.
102. Avantor. A Guide to Effective Laboratory Management [Internet]. [cited 2025 Aug 20]. Available from: <https://www.avantorsciences.com/us/en/support/knowledge-center/guide-to-effective-laboratory-management>
103. Avantor. 8 Ways To Improve Lab Efficiency [Internet]. [cited 2025 Aug 20]. Available from: <https://www.avantorsciences.com/us/en/support/biopharma-education-material/ways-to-improve-lab-efficiency>
104. Unidos Consultoria e Treinamento. Identificação e quantificação das principais causas de perdas para alguns exames do setor de bioquímica em laboratórios clínicos [Internet]. 2020 [cited 2025



- Aug 24]. Available from: [https://www.unidosconsultoria.com.br/post/identificacao-e-quantificacao-das-principais-causas-de-perdas-para-algunas-exames-do-setor-de-bioquimica-em-laboratorios-clinicos?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.unidosconsultoria.com.br/post/identificacao-e-quantificacao-das-principais-causas-de-perdas-para-algunas-exames-do-setor-de-bioquimica-em-laboratorios-clinicos?utm_source=chatgpt.com)
105. SciSure. Our Guide to Optimizing Lab Procurement [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 20]. Available from: Our Guide to Optimizing Lab Procurement
  106. Mueller T, Dieplinger B, Poelz W, Haltmayer M. Utility of the PFA-100 Instrument and the Novel Multiplate Analyzer for the Assessment of Aspirin and Clopidogrel Effects on Platelet Function in Patients With Cardiovascular Disease. *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*. 2009 Dec 19;15(6):652–9.
  107. Instrumentation Laboratory. HemosIL® RecombiPlasTin 2G. 2017 Jun.
  108. Dempfle CE. The Value of D-Dimer Testing in Differentiating Clinical Conditions. Mannheim, Germany;
  109. Taha M, Quental M V., Correia I, Freire MG, Coutinho JAP. Extraction and stability of bovine serum albumin (BSA) using cholinium-based Good's buffers ionic liquids. *Process Biochemistry*. 2015 May 29;50(7):1158–66.
  110. Xiao Y, Isaacs SN. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)–not all BSAs are alike. *J Immunol Methods*. 2012 Oct 31;384(1–2):148–51.
  111. Favaloro EJ. The Russell viper venom time (RVVT) test for investigation of lupus anticoagulant (LA). *Am J Hematol*. 2019 Nov 1;94(11):1290–6.
  112. Atkins P, Jones L. *Princípios de Química: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*. 5º. Nowaczyk D, Amaral V, editors. Porto Alegre, RS: ARTMED EDITORA S.A.; 2012. 116–126 p.
  113. Meijer P. External Quality Control for PFA 100/200. Voorschoten, The Netherlands; 2020.
  114. Favaloro E. Clinical Utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost*. 2008 Nov 12;34(08):709–33.



## 6. Anexo

### Anexo 1

#### Procedimento do Doseamento de Inibidor

1. Preparação do calibrador: Mistura de fator diluente + plasma normal em proporção 50:50, normalmente 200/300  $\mu$ L, dependendo da quantidade de plasma do doente disponível. Este serve como referência de 100% de atividade.
2. Preparação das diluições da amostra:
  - 1:1 – Plasma do paciente + plasma normal, é uma amostra de teste para verificar o efeito do inibidor;
  - 1:2 – (Mistura de plasma do paciente + fator diluente) + plasma normal;
  - 1:4 – (Mistura de plasma do paciente + fator diluente) + plasma normal;
  - As diluições continuam sucessivamente até haver valores suficientes para calcular a unidade Bethesda com precisão.
3. Incubação por 2 horas a 37°C;
4. Quantificação do FVIII (79).

### Anexo 2

Reagente	1º Medição	2º Medição	3º Medição	4º Medição	Média
PT	97	108	102	77	96

**P.PORTO**

ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



**M**

**MESTRADO**

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA