



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
L Instituto de Ciências da Saúde

Relatório de Estágio: Produtos Sanguíneos Lábeis

**Relatório apresentado ao Instituto de Ciências da Saúde da
Universidade Católica Portuguesa, para obtenção do grau de mestre
em Análises Clínicas e Saúde Pública, Especialidade de Hematologia e
Imunohemoterapia**

Por

Soraia Necho Amaral

Porto, 2012



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
↳ Instituto de Ciências da Saúde

Relatório de Estágio: Produtos Sanguíneos Lábeis

**Relatório apresentado ao Instituto de Ciências da Saúde da
Universidade Católica Portuguesa, para obtenção do grau de mestre
em Análises Clínicas e Saúde Pública, Especialidade de Hematologia e
Imunohemoterapia**

Por

Soraia Necho Amaral

Orientadora: Dr.^a Salomé Maia

Co-orientador: Professor Dr. Elísio Costa

Porto, 2012

Resumo

O Instituto Português do Sangue (IPS) é o único organismo competente e responsável pela gestão da medicina transfusional a nível nacional. As suas funções compreendem: a coordenação de todas as atividades relacionadas com a transfusão de sangue, desde a colheita da dádiva à administração do componente sanguíneo; o planeamento do Sistema Nacional de Hemovigilância, certificando-se da segurança dos componentes sanguíneos disponíveis e distribuídos; e a garantia da continuidade dos seus serviços dentro do Sistema Nacional de Saúde pela promoção da dádiva, também com o cumprimento das diretrizes europeias e internacionais. O IPS é uma rede integrada de serviços, dividida por três Centros Regionais de Sangue, localizados no Porto, Coimbra e Lisboa. O Centro Regional de Sangue do Porto (CRSP) é responsável pela colheita, processamento, armazenamento e distribuição dos componentes sanguíneos da região Norte. No CRSP, o processamento das unidades de sangue total nos seus diversos componentes (concentrado de eritrócitos, concentrados de plaquetas e plasma) e o seu armazenamento são assegurados pelo Laboratório de Produtos Sanguíneos Lábeis (PSL). O Laboratório PSL destaca-se pela particularidade de possuir um processador automático das unidades de sangue total (Atreus 3C), tecnologia especializada e desenvolvida pelo CRSP, para a separação diferencial nos vários componentes.

O presente relatório tem por base o estágio de 4 meses realizado no Laboratório PSL do CRSP, cujos objetivos principais foram: a compreensão dos princípios básicos da separação e conservação dos componentes sanguíneos; a integração na rotina laboratorial; a compreensão dos processos de gestão e distribuição dos produtos sanguíneos; a validação da qualidade dos criocomponentes produzidos no CRSP, segundo os requisitos europeus.

Os trabalhos desenvolvidos durante o estágio foram constituídos pela participação na rotina do processamento de unidades de sangue total numa metodologia automática e no controlo da qualidade dos plasmas obtidos no processamento das unidades de sangue total e sua transformação em crio concentrados. Neste âmbito, avaliaram-se as condições de congelação e armazenamento dos plasmas e crioprecipitados obtidos no CRSP, mediante caracterização do choque de frio obtido com os equipamentos disponíveis, e determinação da celularidade, níveis de Fator VIII e Fibrinogénio das unidades de Plasma e Crioprecipitados pré e pós-congelação.

Pode-se concluir que o estágio teve impacto positivo, com os objetivos de aprendizagem cumpridos através das atividades realizadas, sendo importante realçar que os resultados da validação dos criocomponentes foram favoráveis, já que a qualidade dos produtos obtidos pelo laboratório PSL foi confirmada, ainda que as condições de congelação disponíveis não sigam os parâmetros europeus.

Abstract

The Portuguese Blood Institute, IPS, is a competent organization, responsible for managing transfusional medicine nationwide. Its functions include: coordination of all transfusion related activities, from blood donation to blood transfusion; planning the haemovigilance national system, assuring the safety of all blood components available; the guaranty of its continuous services within the national health system, by promoting voluntary blood donation, also with compliance with European and International requirements. IPS is a service structured network divided into three major regional blood centers, located in Porto, Coimbra and Lisbon. The regional blood center in Porto, CRSP, is responsible for blood donation, processing, storage and preservation of whole blood and components in the north region. In CRSP, processing of whole blood into its components (red cells, platelets and plasma) and components storage is assured by the labile blood products laboratory, PSL. This laboratory has the distinctive feature of having developed an automatic whole blood processing system (Atreus 3C).

This report is based on the four months internship held in PSL laboratory with the following goals: understanding of the basic principles of blood processing and storage; incorporating the laboratorial routine; understanding blood components distribution management; validation of cryo blood components (fresh frozen plasma and cryoprecipitate) produced in CRSP, complying with European requirements. The main assignments of this internship were participating in whole blood processing with an automatic method, and assessing the quality of cryo blood components and storage and preservation equipment, available in CRSP. This assessment included assays to determine fibrinogen, coagulation factor VIII and cellular concentration in plasma products before and after freezing.

It's reasonable to conclude that this internship had a positive impact. The achievement of the learning goals allowed the understanding of technical skills required in the PSL laboratory daily routine. Moreover, the results for the plasma products evaluation, confirmed the high quality obtained by CRSP methods, even though the storage and preservation equipment doesn't correspond to the European requirements.

Agradecimentos

Agradeço ao Dr. Elísio Costa, da Universidade Católica Portuguesa, à Dr.^a Salomé Maia, responsável pelo laboratório PSL e orientadora do estágio no CRSP, assim como a todos os profissionais do CRSP pela sua disponibilidade e cordialidade.

Ao José, agradeço a dedicação incansável.

Dedico este projeto aos meus pais e meu avô, por todo o apoio que me deram.

Lista de Abreviaturas

ST – Sangue Total

PVC – Polivinilcloro

CE – Concentrado de Eritrócitos

CP – Concentrado de Plaquetas

VIH – Vírus de Imunodeficiência Humana

ATP – Adenosina Trifosfato

CRSP - Centro Regional do Sangue do Porto

CMV – Citomegalovírus

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

PFC – Plasma Fresco Congelado

CEu – Conselho da Europa

PF – Plasma Fresco

Crio – Crioprecipitado

HCV – Vírus Hepatite C

IPS – Instituto Português do Sangue

PSL – Produtos Sanguíneos Lábeis

PYI – *Platelet Yield Index*

FVIII – Fator de Coagulação VIII

Índice de Conteúdos

I. Introdução	1
1. Breve História da Medicina Transfusional.....	1
2. Componentes Sanguíneos	5
2.1. Sangue Total	5
2.1.1. Anticoagulantes	5
2.1.2. Soluções Aditivas ou Conservantes.....	6
2.1.3. Temperatura de acondicionamento.....	6
2.2. Concentrado de Eritrócitos	7
2.2.1. Indicação Clínica para Transfusão de CE.....	8
2.3. Concentrado de Plaquetas.....	9
2.3.1. Indicação Clínica para Transfusão de CP.....	9
2.4. Componentes criopreservados	10
2.4.1. Congelamento de células	10
2.4.2. Plasma Fresco Congelado.....	10
2.4.2.1. Indicação Clínica para Transfusão de PFC.....	12
2.4.2.2. Fracionamento Industrial de Plasma	13
2.4.3. Crioprecipitado	14
2.4.3.1. Indicação Clínica para transfusão de Crio	15
3. Segurança dos Componentes Sanguíneos	15
3.1. Seleção de Dadores	15
3.2. Testes Pré-Transfusionais.....	17
3.3. Desleucocitação dos Componentes	17
3.4. Inativação Patogénica.....	18
3.5. Conservação e Armazenamento dos componentes sanguíneos.....	20
II. Estágio.....	22
1. Instituto Português do Sangue.....	22
1.1. Breve História da Instituição	22
1.2. Instalações.....	23
1.3. Atividade e Atribuições	23
1.4. Centro Regional de Sangue do Porto	24
2. Laboratório PSL	30

3. Competências e Objetivos	32
4. Atividades Desenvolvidas.....	33
4.1. Processamento das unidades de sangue total	34
4.2. Avaliação das Condições de Conservação dos Comp. Plasmáticos. 44	
4.2.1. Introdução	44
4.2.2. Objetivos.....	45
4.2.3. Material.....	46
4.2.3.1. Amostras	46
4.2.3.2. Equipamentos.....	46
4.2.4. Métodos	46
4.2.4.1. Protocolo para Avaliação da Arca 0619.CRB	46
4.2.4.2. Protocolo para Avaliação da Câmara RF0030.PSL	48
4.2.5. Resultados.....	49
4.2.5.1. Arca 0619.CRB	49
4.2.5.2. Câmara RF0030.PSL.....	50
4.2.6. Comentários.....	51
4.3. Avaliação dos Componentes Plasmáticos Obtidos a partir de Sangue Total.....	52
4.3.1. Introdução	52
4.3.2. Objetivos.....	54
4.3.3. Material.....	55
4.3.3.1. Amostras	55
4.3.3.2. Equipamentos.....	55
4.3.4. Métodos	55
4.3.5. Resultados.....	58
4.3.6. Comentários.....	62
III. Conclusões	63
IV. Bibliografia	67
V. Anexos	70
Anexo A.....	71
Anexo B.....	72
Anexo C.....	73
Anexo D.....	74

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Organização nacional do IPS</i>	23
Figura 2. <i>Unidade móvel de colheitas junto ao edifício do CRSP</i>	24
Figura 3. <i>Evolução da distribuição de componentes sanguíneos pelo CRSP, de 1990 a 2010</i> ..	26
Figura 4. <i>Evolução do número de dádivas de ST colhidas no CRSP de 1990 até 2010</i>	26
Figura 5. <i>Organização do CRSP nos vários departamentos internos</i>	27
Figura 6. <i>Distribuição das atividades do CRSP por quatro tipos de processos relacionados com a gestão, melhoria, realização e apoio dos serviços prestados</i>	29
Figura 7. <i>Calendarização do estágio no CRSP</i>	34
Figura 8. <i>Sistema Atreus 3C, processador automático de ST</i>	35
Figura 9. <i>Unidade de ST rotulada e pronta a processar no Atreus 3C</i>	35
Figura 10. <i>Identificação da unidade de ST, no software do Atreus 3C</i>	36
Figura 11. <i>Carga do equipamento com a unidade de ST</i>	37
Figura 12. <i>Descarga dos produtos da separação, transferidos do saco principal de colheita da unidade de ST, para os sacos satélites</i>	38
Figura 13. <i>Produtos sanguíneos obtidos de uma única dádiva de ST</i>	38
Figura 14. <i>Filtração dos CE por gravidade, para desleucocitação</i>	39
Figura 15. <i>Display do final do Atreus C, após a separação do ST com as características de cada componente</i>	39
Figura 16. <i>Página inicial do software ASM@Porto, para rastreabilidade das unidades</i>	40
Figura 17. <i>Menu de pesquisa de informações sobre unidades processadas, do ASM@Porto</i> ...	41
Figura 18. <i>Resultados de pesquisa, evidenciando dados da gestão do processamento das unidades</i>	41
Figura 19. <i>Registo de processos de separação de ST, por data, e com registo de tempo de separação</i>	42
Figura 20. <i>Registo dos processos de separação por turno</i>	42
Figura 21. <i>Caracterização das unidades de ST, com registos de volume, concentração de hemoglobina e PYI</i>	43
Figura 22. <i>Registo e descrição de erros ocorridos durante processamentos de ST</i>	43
Figura 23. <i>Disposição das sondas nas prateleiras da arca de congelação para o 1º ensaio</i>	46
Figura 24. <i>Arca de congelação a -80°C, para conservação de criocomponentes no CRSP</i>	47
Figura 25. <i>Disposição das sondas e PFC nas prateleiras da arca de congelação para o 2º ensaio</i>	47
Figura 26. <i>Disposição das 8 sondas em 8 cestos plásticos empilhados em pares, na câmara de congelação, para o 1º ensaio</i>	48
Figura 27. <i>PFC armazenados em cestos plásticos distribuídos aos pares no interior da câmara de congelação</i>	48
Figura 28. <i>Disposição das 8 sondas e PFC em 8 cestos empilhados em pares, na câmara de congelação para o 2º ensaio</i>	49
Figura 29. <i>Comparação dos valores de FVIII nos plasmas antes e pós congelamento</i>	61
Figura 30. <i>Comparação entre os valores de FVIII obtidos nos plasmas após congelamento, e os valores mínimos esperados, definidos pelo CEu</i>	61

Índice de Tabelas

Tabela 1. <i>Critérios básicos de Elegibilidade para dadores</i>	16
Tabela 2. <i>Resultados do 1º ensaio da Arca 0619.CRB</i>	50
Tabela 3. <i>Resultados do 2º ensaio da Arca 0619.CRB</i>	50
Tabela 4. <i>Resultados do 1º ensaio da Câmara RF0030.PSL</i>	51
Tabela 5. <i>Resultados do 2º ensaio da Câmara RF0030.PSL</i>	51
Tabela 6. <i>Requisitos de qualidade de PFC definidos pelo CEu</i>	54
Tabela 7. <i>Contagem de células residuais em PFC, em contador celular</i>	59
Tabela 8. <i>Contagem de células residuais em PFC, por citometria de fluxo</i>	60
Tabela 9. <i>Doseamento de FVIII em plasma, antes e após congelamento</i>	60
Tabela 10. <i>Doseamento de Fibrinogénio em PF e PFC</i>	62
Tabela 11. <i>Doseamento de Fibrinogénio em Crio</i>	62

I. Introdução

1. Breve História da Medicina Transfusional

O sangue sempre foi considerado um fluido místico, associado à força vital. A Antiguidade está repleta de práticas como a ingestão de sangue para aquisição de vigor, coragem e longevidade, banhos de sangue como ritual de rejuvenescimento e sangrias para eliminação de doenças.

O conhecimento e compreensão da circulação sanguínea e sua fisiologia só foram divulgados no século XVII, quando William Harvey, médico britânico, publicou a obra “*Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*”, em 1628. Com esse primeiro conhecimento fundamental, várias experiências transfusionais foram feitas, envolvendo animais e humanos. Destaca-se James Blundel, obstetra britânico, como o primeiro a transfundir sangue de um ser humano para outro com sucesso, em 1818, constatando que só deveria ser usado sangue humano para transfusões em humanos.

No entanto, o conhecimento dos grupos sanguíneos só surgiu em 1900, com a descoberta dos grupos A, B e C (posteriormente alterado para O) por Karl Landsteiner, médico austríaco que em 1930 foi galardoado com o Prémio Nobel da Medicina. O estudo de outros grupos sanguíneos continuou, e a compatibilidade entre dador e doente é sugerida como fundamental para a segurança transfusional em 1907 por Hektoen.

A utilização de anticoagulantes de efeito prolongado, a partir de 1914, preparou o caminho para o estabelecimento do conceito do banco de sangue. A responsabilidade de encontrar dadores de sangue foi transferida dos doentes e seus familiares, para o médico e hospital, sendo o primeiro serviço de dadores de sangue criado em Londres, no ano de 1921. Neste serviço, criaram-se painéis de dadores

que seriam solicitados quando necessário, com o apoio da Cruz Vermelha Britânica.

Mas foi a Segunda Grande Guerra que mais evidenciou a necessidade de reservas de sangue prontas a administrar, aproximando-se do conceito de banco de sangue atual, com recrutamento em massa de doadores voluntários, e levando à criação de serviços nacionais de saúde e de redes regionais e nacionais interligadas de serviços de sangue para produzir e distribuir componentes sanguíneos de acordo com protocolos e critérios muito rigorosos, nacionais e internacionais, aperfeiçoados ao longo do tempo. ^[1,2,3]

A medicina transfusional foi explorada e desenvolvida sobretudo em tempo de guerra. Enquanto na Primeira Grande Guerra era frequente o uso de sangue total (ST) e colóides artificiais e salinos, na Segunda Grande Guerra, já com o fracionamento de Cohn, surgiu o uso disseminado de albumina e plasma liofilizado. O uso excessivo de cristaloides foi diminuindo nos anos 90, com o surgimento de complicações pós-transfusionais como o síndrome de *stress* respiratório agudo e falência múltipla de órgãos.

Nos últimos 40 anos, a medicina transfusional evoluiu do uso predominante de ST, para terapêuticas com componentes sanguíneos e derivados.

Apesar do uso de ST em rotinas médicas de emergência militar e em países em vias de desenvolvimento, os componentes sanguíneos predominam na prática transfusional, principalmente devido a questões de segurança transfusional e seguindo o princípio do máximo aproveitamento da dádiva de sangue. Este aproveitamento da dádiva é possível com a utilização de sacos para colheita de sangue em polivinilclorato (PVC), com sacos satélites acoplados que possibilitam a transferência de frações de sangue para estes sacos em sistema fechado. Desta forma, asseguram-se as condições para o armazenamento dos diferentes componentes do sangue, concentrados de eritrócitos (CE), concentrados de plaquetas (CP) e plasma a partir de uma única unidade de ST. Este sistema também possibilita o armazenamento de cada componente nas temperaturas mais adequadas à sua sobrevivência, assim como a criocongelamento para serem transfundidos ou sofrerem processamentos adicionais, que permitam a preparação de produtos específicos para situações clínicas particulares.

Atualmente, há uma série de estudos que corroboram o uso de CE e CP e de componentes plasmáticos em contexto de profilaxia ou terapêutica. No entanto, o uso crescente destes componentes tem sido associado ao risco aumentado de reações alérgicas, lesão pulmonar, sobrecarga cardíaca, e apesar de não haver estudos sobre o impacto futuro do uso destes componentes, a medicina transfusional adota a melhor estratégia de transfundir apenas o componente necessário.

Relativamente ao futuro, é possível que integre o uso de componentes liofilizados, com claras vantagens logísticas: volume e peso muito diminuto e armazenamento a temperatura ambiente.^[4]

Ao longo da história da medicina transfusional, assiste-se a uma evolução permanente e uma forte aceleração a partir dos anos 80, com o aparecimento do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Este foi um ponto crítico da evolução desta especialidade médica, foi uma tragédia sentida a nível mundial e que exigiu não só um esforço de alteração e padronização de procedimentos nos critérios de seleção de dadores, como também empurrou a indústria de desenvolvimento de tecnologias laboratoriais para a deteção de agentes transmissíveis para um caminho de constante inovação que permanece ainda hoje.^[5]

Neste panorama assistiu-se a uma mudança de atitudes por parte dos intervenientes do processo transfusional até aqui desconhecida, isto é, a necessidade de segurança uniu os especialistas a nível mundial que iniciaram um diálogo e um canal de comunicação com resultados muito positivos com elaboração de guias e requisitos, não só para os dadores como também para os produtos.

Esta epidemia representou graves consequências que obrigaram ainda os dirigentes e políticos a mobilizarem os meios, e agilizarem no seio a sua realidade política, as ferramentas necessárias para que os grupos de trabalho e aconselhamento se dotassem da formalidade e autoridade necessárias ao desenvolvimento de um trabalho consequente e adequado.

Estes foram os embriões para que hoje, cabalmente estruturados, tivessem nascido os sistemas de hemovigilância e materiovigilância, fundamentais no acompanhamento contínuo da atividade da medicina transfusional, assim como para o constante desenvolvimento da indústria farmacêutica e de reagentes com a

consequente evolução da tecnologia e ainda das diretivas europeias relacionadas com a atividade da medicina transfusional e transpostas para o quadro legal dos diferentes países que integram a comunidade europeia. No quadro legal português, a definição de autoridade competente dos serviços de sangue e medicina transfusional, suas atribuições e competências, estão descritas nos Decretos-Lei nº267-2007 e nº 270-2007, e nas Portarias nº 165/2012 e nº 811-2007.

2. Componentes Sanguíneos

2.1. Sangue Total

A unidade de ST contém todos os elementos sanguíneos constituintes do sangue e o anticoagulante que o próprio saco de colheita contém. É usado como fonte de produção de componentes sanguíneos, sendo portanto a matéria-prima que dá origem aos componentes da prática transfusional. O ST, como tecido vivo que é, sofre degradação natural, e após 24 horas de armazenamento a 20-24°C, ocorrem alterações irreversíveis tais como: diminuição de funcionalidade das plaquetas, diminuição da concentração de fatores de coagulação lábeis e, ao longo do armazenamento, liberação de fatores intracelulares em consequência da degradação das propriedades da membrana celular, que se torna mais permeável.

Esta degradação natural agrava-se quando não é possível utilizar os meios de conservação e armazenamento mais adequados para cada tipo celular.

A utilização de ST como componente terapêutico não tem atualmente aplicação, sendo portanto pouco frequente nos serviços de sangue, estando restrita a situações de hemorragia maciça, em que o volume total de sangue tem de ser recuperado simultaneamente com a manutenção ou recuperação da função hemostática eficaz.

[6]

2.1.1. Anticoagulantes

Os anticoagulantes constituídos por citrato de sódio, ácido cítrico, dextrose e fosfato de sódio, como são exemplos o CPD e o CP2D (do inglês *Citrate, Phosphate Dextrose*, a composição do anticoagulante), permitem a conservação de eritrócitos entre 1-6°C, por 21 dias.

O CPDA-1 (do inglês *Citrate, Phosphate Dextrose, Adenine*, a composição do anticoagulante), constituído por citrato de sódio, ácido cítrico, dextrose, fosfato de sódio e adenina, permite o armazenamento entre 1-6°C, por 35 dias. Este anticoagulante permite estender o prazo de armazenamento porque possui adenina, um substrato através do qual os eritrócitos produzem adenosina trifosfato (ATP), o que resulta num aumento da viabilidade celular.

É importante o “ratio” entre o volume de anticoagulante e o volume de sangue; sendo a razão de 1,4:10 considerada a ideal. Normalmente cada saco de colheita tem 63 mL de anticoagulante para permitir a colheita de um volume padrão de sangue adequado a um adulto saudável de 60 Kg, ou seja uma colheita de 450 mL +/-10%, tendo em consideração que o volume máximo de extração aconselhado é de 10,5 mL por quilo de peso. ^[6]

2.1.2. Soluções Aditivas ou Conservantes

As soluções aditivas ou conservantes contêm na sua constituição citrato de sódio, dextrose, adenina, fosfato de sódio, manitol e cloreto de sódio, podendo ou não conter ácido cítrico. Estas soluções funcionam como um tampão, atrasam as alterações bioquímicas e moleculares, e permitem aumentar a sobrevivência dos eritrócitos, favorecendo a preservação da membrana celular e o metabolismo residual das células, o que origina unidades de melhor qualidade.

Mesmo entre 1-6°C, as células continuam metabolicamente ativas, e os níveis de ATP durante o armazenamento estão correlacionados com a viabilidade pós-transfusional no recetor. Apesar do armazenamento a baixas temperaturas diminuir a atividade glicolítica, os anticoagulantes e as soluções aditivas possuem dextrose em quantidade suficiente para prolongar a produção de ATP pelos processos glicolíticos aeróbicos. ^[6,7]

2.1.3. Temperatura de acondicionamento

Cada componente tem a sua temperatura ótima de armazenamento, contudo é também importante a temperatura de acondicionamento antes da preparação do componente.

Assim, para a preparação de plaquetas o ST deve ser transportado e armazenado entre 20-24°C; se não forem preparadas plaquetas, a unidade pode ser armazenada entre 1-6°C até ser processada; o plasma, idealmente, deve ser separado dos eritrócitos até 8 horas após colheita de modo a prevenir perdas de fatores de coagulação, no entanto, na logística de funcionamento da produção de componentes tal não é possível em todas as unidades colhidas. Os estudos e validações do

Controlo de Qualidade são críticos para que se encontrem os tempos e temperaturas ideais de produção por forma a obter a maior quantidade possível de componentes com as características de qualidade e segurança pretendidas.^[6]

2.2. Concentrado de Eritrócitos

A preparação de CE consiste na remoção do plasma sobrenadante e da camada leucoplaquetária do ST depois de centrifugado.

Este é um processo manual ou semiautomático constituído por vários subprocessos, cada um deles sujeito a monitorização e controlo. Partindo de uma matéria-prima, o ST, cuja variabilidade biológica é uma característica intrínseca, cada componente deve responder a um conjunto de requisitos de qualidade e segurança exigentes. É fácil perceber que, com a utilização de um processo de produção complexo e manual, com vários subprocessos, é difícil não só atingir os padrões pretendidos, como apresentar uma estabilidade e robustez de produção desejáveis. Além disso, este é um processo de produção vulnerável e sujeito a variações relacionadas com um enorme conjunto de variáveis, nem sempre identificáveis ou passíveis de correção.

Assim, com o intuito de melhorar a eficácia deste processo, o Centro Regional de Sangue do Porto (CRSP) participou desde 2003 no desenvolvimento de um processo completamente automático de preparação de componentes, o Atreus 3C, que dispensa todas as etapas manuais e regista todas as etapas do processo, assim como as características de cada componente, permitindo uma rastreabilidade completa em todas as fases do processamento. Esta rastreabilidade é completa, isto é, é possível em qualquer momento do processo, verificar qual a colheita, o dador, o operador, os componentes obtidos e suas características, qual o equipamento e hora de produção.

Os CE são então sujeitos ao processo de desleucocitação por filtração, antes do seu armazenamento. A desleucocitação é requisito obrigatório em Portugal desde 1999, já que os leucócitos estão envolvidos em várias reações pós-transfusionais tais como infeção por Citomegalovírus (CMV) e reações febris, sendo também responsáveis pela aloimunização do recetor em relação aos antigénios do sistema de

antigénios leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*), que são também os principais hospedeiros dos priões.

Os CE desleucocitados não devem possuir mais de 1×10^6 leucócitos por unidade, o volume unitário deste componente deve ter uma média de 280 ± 50 mL. A concentração celular do CE é igual à do ST, com um hematócrito entre 0,65 e 0,75 e um mínimo de 40 g de hemoglobina por unidade.

O armazenamento do CE deve ser efetuado em câmara de frio a temperaturas entre 2-6 °C, por 42 dias em solução aditiva adequada. [6,8,9]

2.2.1. Indicação Clínica para Transfusão de CE

A utilização e transfusão de CE estão indicadas para casos de anemia com hemoglobina < 6 g/dl e sintomas típicos de anemia como dispneia de esforço e pré-cardioalgia, em situação clínica de hematócrito inferior a 20%, e na realização de intervenções cirúrgicas.

São também grandes consumidores de CE, a especialidade de oncologia e as terapêuticas agressivas que se utilizam nestas circunstâncias, assim como na área de suporte do transplante.

Apesar do nível de hemoglobina ser fundamental, deve-se ter em atenção a reologia da circulação capilar, mantendo-se o hematócrito baixo mas suficiente para o transporte de O_2 , pelo que a decisão de transfusão não deve estar baseada em dados laboratoriais mas sim no estado clínico do doente. São vários os fatores condicionantes para a eficácia da transfusão de CE, já que a quantidade de O_2 libertado na circulação periférica depende não só da quantidade de eritrócitos transfundidos e perfusão do sangue, mas também da saturação arterial de O_2 , da afinidade da hemoglobina para o O_2 e das necessidades metabólicas de O_2 do momento. [6, 9, 10, 11]

2.3. Concentrado de Plaquetas

O CP é um hemocomponente preparado a partir de ST conservado a temperatura de 20°C. A separação deste componente baseia-se numa concentração das plaquetas após centrifugação do ST, sendo removido o plasma sobrenadante.

Este componente é bastante delicado devido à facilidade de reatividade que este tipo de células apresenta, devendo ser tomadas precauções para prevenir a sua aglutinação, adesividade e agregação durante a sua preparação e enquanto armazenadas. Fatores como o material do saco de colheita, o anticoagulante, o tipo de agitação e a temperatura de armazenamento são controlados para o componente não sofrer alterações indesejáveis.

O seu armazenamento deve ser a temperaturas entre 20-24°C, com agitação contínua controlada por um período máximo de 5 dias. Este componente deve ter uma razão entre o volume e a concentração de células de 40 ml de solução de suspensão por cada 60×10^9 plaquetas, com uma concentração inferior a $1,5 \times 10^3$ plaquetas/ μ l e com um pH acima dos 6,4 em qualquer momento da sua sobrevivência.

Também são produzidas *pools* de concentrados de plaquetas desleucocitadas, preparadas a partir de CP unitários, sendo este o componente que é disponibilizado ao doente, ou seja, o produto final após manipulação e que permite administração imediata sem manobras adicionais. [6, 8, 9]

2.3.1. Indicação Clínica para Transfusão de CP

Estes concentrados são indicados, não só para casos de trombocitopenia (plaquetas $<10 \times 10^9/L$), mas também como profilaxia ou tratamento de sintomatologia hemorrágica.

Este produto é fundamental no suporte da quimioterapia e transplantação, sem o qual não seria possível realizar estes procedimentos médicos e cirúrgicos. [6, 9, 10]

2.4. Componentes crioconservados

2.4.1. Congelamento de células

O congelamento celular tem que ser um processo controlado visto que as condições de descida de temperatura, o agente crioprotetor e sua concentração são críticos para obter um componente sanguíneo com a qualidade celular requerida.

Quando a temperatura diminui bruscamente, o gradiente osmótico não se estabelece, e a desidratação e redução de volume são mínimas, havendo formação de cristais intracelulares com a conseqüente destruição celular.

Quando a temperatura diminui a uma taxa inferior a 10°C/min, a água extracelular congela primeiro que a intracelular, produzindo gradiente osmótico que faz com que a água se movimente do interior da célula para o exterior, provocando hipertonicidade, desidratação e dano celular. ^[6]

Os eritrócitos sofrem várias alterações com o armazenamento, desde alterações morfológicas que implicam menor deformabilidade (aumentando a probabilidade de obstrução da microcirculação), a diminuição de 2,3-difosfoglicerato e menor afinidade de O₂ que causa menos oxigenação dos tecidos. Com o armazenamento aumenta a produção de mediadores inflamatórios como citocinas e lípidos que estão envolvidos em reações febris e de imunomodulação. ^[7]

Assim, a metodologia de crio conservação e descongelação para utilização terapêutica, tem que considerar este equilíbrio entre o teor intra e extracelular para conseguir manter a viabilidade celular. Os agentes crioprotectores mais utilizados são o glicerol em altas ou baixas concentrações e o dimetilsulfóxido. ^[6]

2.4.2. Plasma Fresco Congelado

O plasma é um componente sanguíneo que pode ser obtido a partir de uma colheita de ST ou por processo de colheita de aférese e denomina-se plasma fresco congelado (PFC) quando é sujeito a congelamento a uma temperatura que permita a manutenção da sua qualidade enquanto componente destinado a transfusão.

Este componente deve ser constituído por água, eletrólitos, albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação (fibrinogénio, VIII e Von Willebrand, e também os fatores VII a XI, e XIII em menor concentração) dentro das concentrações definidas no Guia do Conselho da Europa e com valores considerados normais para a população em geral. Estão também descritos certos critérios de seleção que devem ser seguidos, nas áreas da Serologia, Hemostase e Hematologia, como por exemplo, a ausência de certos marcadores víricos e de anticorpos irregulares.

O PFC necessita de armazenamento a temperaturas muito baixas, de modo a manter a funcionalidade dos fatores de coagulação lábeis, no entanto, o processo de congelamento provoca danos nas moléculas das proteínas constituintes dos fatores de coagulação e pode também permitir o seu consumo se o processo de descida de temperatura for acompanhado de desidratação e trauma mecânico.

Neste contexto, está também parametrizada pelo Conselho da Europa (CEu) uma recuperação do Fator de Coagulação VIII dentro de níveis definidos após processamento do plasma, assim como um número de células residuais abaixo de limites estabelecidos, e aqui falamos da pureza do componente.

O cumprimento destes critérios garante a qualidade e eficácia clínica do PFC.

No CRSP, o processamento de plasma é obtido por aférese e por unidades de ST refrigerado imediatamente após a colheita até aos 20°C e acondicionado em placas de butanodiol. O plasma é separado com recurso a um processador automático ATREUS 3C, em intervalos de tempo entre as 2 e as 24 horas após colheita, sendo a seleção destes intervalos definida pelas necessidades de rotina. O plasma obtido neste sistema é também desleucocitado.

Após o processo de separação, a conservação do plasma deve ser feita por congelamento em sistemas que permitam atingir temperaturas inferiores a -30°C no intervalo de 1 hora. Se for armazenado entre 20-24°C (placas de butanodiol), essas condições permitem um intervalo de 24 horas entre a colheita e o congelamento.

No processamento de plasma a partir de aférese, o componente desejado é retirado diretamente da circulação sanguínea do dador por sistema automatizado. As condições de congelamento devem ser as mesmas referidas anteriormente.

A validade dos PFC varia de 3 meses, a temperaturas entre -18°C a -25°C, a 3 anos, a temperaturas inferiores a -25°C, até 7 anos de armazenamento a -80°C. [6, 8]

As temperaturas inferiores a -30°C inibem o crescimento e metabolismo bacteriano, mas é de referir que o congelamento não tem efeito sobre a eliminação de vírus como os de Hepatite e VIH ou outros agentes conhecidos ou não.

No entanto, o circuito de obtenção do PFC, inclui desde o início, um controlo de qualidade ao método e componentes para minimizar riscos e garantir qualidade dos produtos e estabilidade do processo. Essa monitorização vai desde a assepsia da colheita de sangue, o material dos sacos de colheita, até aos sistemas automatizados de separação, acondicionamento e transporte.

Dentro deste contexto, o congelamento, armazenamento e descongelamento devem ser concebidos e selecionada uma metodologia que garanta os requisitos de qualidade do plasma fresco (PF) e PFC, relativamente ao conteúdo em fatores de coagulação assim como a sua atividade funcional. Já o descongelamento do PFC deve ser feito em banho-maria, a temperaturas de cerca de 37°C , e a metodologia deve ser definida de modo a evitar o risco de contaminação bacteriana. Sistemas de aquecimento em seco podem também ser aplicados, já que minimizam o risco de desnaturação das proteínas plasmáticas. Após descongelamento, o PFC deve ser transfundido imediatamente ou armazenado entre $1-6^{\circ}\text{C}$ e no máximo de 24 horas. Este hemocomponente é também a matéria-prima para o fabrico de concentrados de fatores de coagulação por fracionamento, um processo industrial. ^[12]

2.4.2.1. Indicação Clínica para Transfusão de PFC

O PFC é fonte de fatores de coagulação para suporte transfusional, sendo administrado em situações de deficiências congénitas de fatores de coagulação, acompanhadas de hemorragia ou trombose, quando não há concentrados disponíveis.^[6] Existem contudo situações clínicas onde o PFC não tem substituto, sendo utilizado para procedimentos de troca plasmática por aférese, como nos casos de hemoglobinúria paroxística noturna e síndrome hemolítico urémico, onde se encontram défices de fatores da coagulação, ou enzimas que só existem no plasma fresco. A sua administração concentra-se mais na profilaxia, não devendo ser utilizado para reposição de volume, como suporte nutricional, nem como tratamento para situações de imunodeficiência.

Deve ser tomada em conta a compatibilidade ABO para evitar hemólise, e podem ocorrer efeitos adversos como lesão pulmonar aguda pós-transfusão. ^[10,13]

2.4.2.2. Fracionamento Industrial de Plasma

O processamento industrial do plasma é o maior mercado de proteínas terapêuticas da atualidade e compreende um investimento elevadíssimo, proporcionando a obtenção de produtos como concentrados de albumina, imunoglobulinas e de Fator VIII, IX, assim como complexos de fatores.

Os derivados do sangue são assim designados porque são produtos obtidos dos hemocomponentes após manipulação industrial, que pressupõe a mistura inicial de um número elevado de unidades (*pool* inicial) para a obtenção do produto final.

A obtenção de hemocomponentes a partir duma dádiva de ST, é possível com recurso a centrifugação diferencial que permite a separação dos hemocomponentes devido às suas diferentes densidades e massas, e esta primeira fase é realizada em bancos de sangue como é o caso do CRSP. Esta separação resulta em hemocomponentes de elevada qualidade, que serão ainda submetidos a rigoroso controlo químico e microbiológico, antes de serem transfundidos.

O fracionamento de plasma teve início na década de 40 com Edwin Cohn, químico norte-americano que desenvolveu um método de precipitação plasmática que lhe permitiu obter uma fração proteica purificada rica em albumina, a chamada fração de Cohn. Este fracionamento cumpriu o propósito de isolar a albumina para o tratamento de hemorragias e ferimentos da Segunda Grande Guerra, fazendo deste produto a pedra basilar da indústria plasmática até aos anos 90. O método de Cohn implica uma série de processos de purificação e concentração até ao produto final, com ótima segurança transfusional. Este é um fracionamento alcoólico a frio, e apoia-se na solubilidade diferencial das proteínas e em variáveis como o pH, temperatura, concentração proteica e de etanol e força iónica.

Assume-se o princípio de que a albumina possui maior solubilidade e menor ponto isoelétrico de todas as proteínas presentes no plasma, logo será a última proteína a precipitar. A albumina mantém-se, portanto, no sobrenadante durante a separação das frações sólido-líquido de cada suspensão proteica obtida. Deste modo, em cada precipitação concluída, obtém-se uma fração proteica purificada e específica. Esta

metodologia baseada em precipitações seletivas possibilita a obtenção de vários derivados do mesmo hemocomponente numa só extração.

A produção de concentrados de albumina segue principalmente o método de fracionamento de Cohn, no entanto existem inúmeras variações deste processo, assim como fusão com tecnologias como a cromatografia de intercâmbio iônico, que separa as proteínas de acordo com a sua carga iônica.

Desde então, a indústria dos hemocomponentes tem evoluído, com a produção de concentrados de Fator VIII liofilizado nos anos 70 e 80, destacando-se a investigadora americana Judith Pool com o seu processo de produção de crioprecipitados e concentrado de Fator VIII para tratamento da hemofilia, e a produção de concentrados de imunoglobulinas, também graças ao método de Cohn. O plasma fracionado encontra-se armazenado em grandes *pools* de múltiplas dádivas e o seu elevado conteúdo proteico inclui também contaminantes. O fracionamento impõe maior variabilidade nas características do produto final, visto que, devido ao próprio processo de precipitação, as proteínas podem estar estruturalmente alteradas.

A este processo de separação das proteínas plasmáticas adicionaram-se mais tarde várias etapas de segurança microbiológica e vírica como o tratamento pelo calor, por solvente-detergente e pasteurização. Estes produtos têm um custo muito elevado de produção, mas destinam-se a uma população muito restrita com necessidades terapêuticas muito específicas. ^[14, 15, 16, 17]

2.4.3. Crioprecipitado

Quando o PFC sofre descongelamento a uma temperatura de cerca de 4°C, forma-se um crioprecipitado (Crio) constituído por Fator VIII, Fibrinogénio, Fator Von Willebrand e Fator XIII, com um volume de cerca de 10 mL. O Crio é, portanto, a porção insolúvel do plasma, um concentrado de glicoproteínas de alto peso molecular. Não se pode sujeitar o PF a mais de um 1 ciclo de congelamento, com o risco de prejudicar a qualidade dos fatores de coagulação. Este tipo de plasma descongelado em ambiente refrigerado é utilizado para fracionamento comercial na produção de produtos plasmáticos em *pools*. ^[6,12]

2.4.3.1. Indicação Clínica para transfusão de Crio

O Crio é fonte de fatores de coagulação e também matéria-prima para o fabrico de concentrados de fatores obtidos por fracionamento. É utilizado no tratamento da hemofilia A, doença de Von Willebrand, défices de Fibrinogénio e Fator XIII.^[6,12]

Contudo existem atualmente concentrados de fatores que o substituem com maior segurança e a sua utilização praticamente se resume a poucas situações de coagulação intravascular disseminada, e/ou hemorragia maciça.^[18]

3. Segurança dos Componentes Sanguíneos

Desde que surgiu o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida na década de 80, e após o incidente da transmissão do vírus VIH a milhares de pacientes transfundidos, que os Bancos de Sangue se aperceberam da sua vulnerabilidade face a micro-organismos desconhecidos, e da necessidade dum maior e contínuo investimento na segurança dos componentes sanguíneos.

A segurança destes componentes passa por vários processos desde a seleção de dadores pertencentes a uma população de baixo risco, a testes pré-transfusionais, à desleucocitação dos componentes e inativação patogénica, até ao seu armazenamento eficaz e seguro.^[19, 20]

3.1. Seleção de Dadores

A avaliação de dadores é um processo rigoroso com o objetivo de classificar potenciais dadores como aceitáveis ou inadequados, de modo a obter dádivas seguras para o doente que vai receber o sangue ou componente sanguíneo.

Esta avaliação compreende o preenchimento de um questionário com dados inequívocos de identidade e uma entrevista pessoal com um profissional de saúde qualificado, para estudar sumariamente o histórico clínico do doente. O dador é selecionado mediante critérios de elegibilidade/exclusão.

Os critérios de elegibilidade para dádivas homólogas encontram-se na Tabela 1 e para além da idade e peso do dador, concentram-se especialmente nas características bioquímicas e celulares da dádiva de ST. É de referir que o médico e o serviço de sangue podem autorizar dadores com mais de 65 anos.

Tabela 1. *Crítérios básicos de Elegibilidade para dadores*

Crítérios de Elegibilidade	
Idade	18 a 65 anos
Peso	≥50 Kg
Hemoglobina	≥125 g/L na mulher ; ≥ 135 g/L no homem
Plaquetas	≥150/Lx10 ⁹ /L
Proteínas	≥60g/L

Os critérios de exclusão para dádivas homólogas centram-se no histórico clínico do dador, nomeadamente doenças infecciosas que se transmitem através de contacto com sangue, mas também situações de transfusões prévias, utilização de drogas (por administração intravenosa ou intramuscular), doenças cardiovasculares, doenças parasitológicas e coagulopatias, entre outros.

Anteriormente, a orientação sexual dos candidatos a dadores era explicitamente interrogada, sendo que indivíduos que se declarassem como homossexuais eram imediatamente excluídos. Atualmente já não ocorre essa discriminação explícita, mas desde a publicação da diretiva europeia 2004/33/EC Anexo III, ponto 2.1, define-se a exclusão permanente de pessoas com comportamentos sexuais que os coloque em risco de adquirir doença infecciosa, mas a definição de práticas de risco ou alto risco, ainda está em debate.^[21]

Ao dador deve ser fornecida informação sobre a natureza imprescindível do sangue e da dádiva, sobre componentes derivados do sangue e os seus benefícios para os doentes, também dos riscos associados às dádivas, autólogas ou homólogas, e a possibilidade de exclusão ou suspensão do estatuto de dador. Compreendidas todas estas informações e após esclarecimento de dúvidas, o dador deve assinar o consentimento informado.

Durante o processo de colheita, a verificação e registo da identidade do dador é crítica, assim como o estabelecimento da relação entre o dador e a dádiva, estes passos são fundamentais para permitir a rastreabilidade das unidades transfundidas.

Os critérios de suspensão temporária incluem situações de infeção, sintomas gripais, febre superior a 38°C, sendo a suspensão de mínimo de 2 semanas após a recuperação clínica total. Vacinação com vírus/bactérias atenuados implica suspensão de 4 semanas, e situações mais graves como brucelose, febre Q, sífilis, toxoplasmose e tuberculose, implica períodos de suspensão desde 6 meses até 2 anos. No caso especial do paludismo a suspensão é de 6 meses a 3 anos, dependendo do contexto de exposição ao agente infeccioso, se o dador reside em local endémico, se foi apenas visitante ou se tiver antecedentes. No caso de gravidez, a suspensão é de 6 meses. [22]

O envelhecimento populacional associa-se a um decréscimo do índice da dádiva e maiores critérios transfusionais. É importante a planificação da promoção da dádiva e gestão de *stocks*, o estudo populacional regional e obtenção de informações demográficas e sua evolução no tempo. [23]

3.2. Testes Pré-Transfusionais

No momento da dádiva são colhidas amostras laboratoriais para efetuar tipagem ABO/RhD, e testadas para Hepatite B (antigénio HBs), Hepatite C (anticorpo anti-HCV, do inglês *Hepatitis C Virus*) e VIH 1 e VIH 2.

3.3. Desleucocitação dos Componentes

A desleucocitação é prática obrigatória legalmente desde Novembro de 1999, em CE e CP, com o objetivo de prevenção da transmissão de vírus intra leucocitários como o CMV, e também como prevenção de fenómenos de aloimunização, imunomodulação, assim como possibilita a redução dos efeitos nocivos do armazenamento nos eritrócitos. Os filtros utilizados têm capacidade de remoção de leucócitos de cerca de 99,9%. As diretivas europeias indicam que os CE devem ter valor de leucócitos $<1 \times 10^6$. [7,24]

3.4. Inativação Patogénica

Para além da desleucocitação, os componentes plasmáticos são sujeitos a inativação vírica por métodos físicos e químicos, ou por irradiação. A Medicina Transfusional tem na sua base boas práticas que minimizam o risco transfusional, desde a implementação de estratégias que contemplem o rastreio de dadores, até à análise das unidades após a colheita e processamento, assim englobando a eliminação de dadores e unidades potencialmente infetadas.

As técnicas de inativação ou redução patogénica são métodos implementados na última fase de processamento dos componentes sanguíneos e possuem espectro biológico mais ou menos alargado, no entanto será sempre limitado ao conhecimento atual dos agentes patogénicos.

Ao sujeitar componentes sanguíneos a qualquer tipo de tratamento químico, é essencial poder manter a sua qualidade e segurança, ou poder prever eventuais perdas em parâmetros fundamentais para a eficácia da sua aplicação terapêutica. Tais perdas não deverão ter repercussão clínica, nem a sua aplicação apresentar uma ameaça à segurança, pela introdução de produtos químicos.

O PF é um componente sanguíneo administrado principalmente em situações de coagulopatias, e a sua inativação confere uma maior segurança enquanto produto biológico.

Vários tratamentos químicos de inativação têm sido estudados e desenvolvidos, com diferenças nos métodos, potencial de toxicidade e eficácia:

- Tratamento Solvente-Detergente

A ação do detergente consiste na destabilização do invólucro lipídico de vírus e da bicamada lipídica da membrana plasmática de organismos procarióticos ou eucarióticos. O solvente, por sua vez, divide as moléculas lipídicas, expondo o conteúdo celular e levando à sua destruição.

Este tratamento é especialmente destinado à inativação de componentes plasmáticos, devido á sua atividade lítica celular. Por isso mesmo, é fundamental a remoção dos químicos aplicados nos componentes, antes da transfusão, para

impedir reações adversas no recetor. O processo de remoção do detergente e solvente implica vários passos de filtração, extração, e cromatografia. Devido ao complexo protocolo do método, não é viável efetuá-lo para unidades individuais, por isso é feito em *pools* de plasma.

Este tratamento tem demonstrado eficácia na redução de vírus com invólucro, bactérias e protozoários, e é acompanhado de alguma redução nos níveis de fatores de coagulação. No entanto, grande parte das reduções não são consideradas clinicamente significativas. [25,26]

- Tratamento com Psoralen

O composto Psoralen, ou Amotosalen, é um composto heterocíclico de distribuição ubíqua na natureza, com a capacidade de se intercalar entre pares de bases de nucleótidos. Esta reação é ativada por luz ultravioleta no comprimento de onda de 320-400 nm. Nestas condições, o Amotosalen age como intermediário estrutural no cross-linking de resíduos de ácidos nucleicos complementares, impedindo a sua replicação.

O atual sistema em uso, INTERCEPT, Cerus Corporation, conta com equipamento de absorção de compostos que contém carvão ativado para recolher Amotosalen não incorporado nos nucleótidos, assim como fotoprodutos residuais.

Este tratamento em ensaios biológicos e estudos *in vitro*, não revelou atividade tóxica nem mutagénica nas quantidades usadas para tratamento dos componentes. No entanto, verificou-se diminuição no nível de fatores de coagulação, apesar de ser considerada clinicamente aceitável. [25,26]

- Tratamento com Azul-de-metileno

O Azul-de-metileno é um corante de tiazina, frequentemente usado como agente antimicrobiano e desinfetante. O seu mecanismo de ação consiste na clivagem fotoactivada a um comprimento de onda entre 620 e 670 nm, de cadeias de ácidos nucleicos em resíduos de guanina. Este composto não é incorporado no ácido nucleico, no entanto os componentes assim tratados devem ser filtrados para a sua

remoção. Este tratamento tem revelado redução de vírus com invólucro tais como os da Hepatite B e C e VIH, mas também para os sem invólucro como o Parvovírus B19. A toxicidade deste composto ainda não está bem estabelecida, apesar de existir já um uso considerável do processo. ^[25,26,27]

- Tratamento com Riboflavina

A Riboflavina, ou Vitamina B2, é um composto heterocíclico fotoreactivo que catalisa a clivagem, por transferência de eletrões e oxidação, dos resíduos de guanina e fragmentação da dupla hélice. A Riboflavina é ativada num intervalo maior de comprimentos de onda, em luz visível ou ultra violeta.

O único sistema comercial aprovado para inativação patogénica de componentes sanguíneos com riboflavina é o Mirasol PRT; CaridianBCT, Lakewood, CO. Este sistema usa radiação UV com uma concentração de Riboflavina de 50 µmol/L.

A Riboflavina tem ação inespecífica através de radicais de oxigénio, nos componentes proteicos e lipídicos do agente patogénico e demonstra eficácia tanto em vírus com invólucro lipídico como em vírus sem invólucro como o Parvovírus B19. Provou também ser eficaz na redução bacteriana. O facto deste composto ser natural e ubíquo na natureza, faz com que seja considerado seguro, não sendo necessária a remoção do mesmo. Novamente se verificam reduções clinicamente não significativas nos fatores de coagulação. ^[25,26]

3.5. Conservação e Armazenamento dos componentes sanguíneos

A conservação e armazenamento dos componentes de sangue são alguns dos pontos críticos da atividade transfusional. A cadeia de frio do Banco de Sangue tem um papel fundamental na manutenção dos hemocomponentes. É necessário estabelecer quais as condições mínimas específicas para manter a qualidade de cada componente sanguíneo.

A obtenção de componentes de qualidade não é suficiente para garantir, não só a estabilidade dessa mesma qualidade, como também a segurança dos componentes.

Tem que existir uma cadeia de condições de acondicionamento, responsável pela definição das condições de armazenamento temporário do ST e dos componentes.

Já foi referido também que a cada componente correspondem uma série de especificações de acondicionamento e armazenamento que são substancialmente diferentes, de acordo com cada tipo de componente. Assim o ST, para possibilitar um equilíbrio entre as características reológicas das células que o constituem, para que permitam a melhor interface para a separação dos diferentes grupos celulares e o risco de contaminação bacteriana, é acondicionado até á sua separação em condições controladas. Para isto são utilizadas placas de arrefecimento de butanodiol, que ao facilitarem um rápido arrefecimento até aos 20°C, mantêm esta temperatura durante um período de tempo também determinado.

Os componentes obtidos são manuseados em temperatura ambiente controlada entre 19 a 22°C, dispendo o laboratório de controlo de temperatura permanente.

Depois de obtidos os componentes, estes são armazenados respeitando as características celulares e uma vez mais respeitando o compromisso entre estas necessidades e a contaminação e proliferação bacteriana.

Assim, os CE são armazenados em câmaras de 4°C, as plaquetas em câmaras de 22°C e os componentes plasmáticos a -30°C. As condições para armazenamento de plasmas e outros componentes plasmáticos no banco de sangue são as exigidas pelos requisitos necessários para estes componentes e adequadas ao volume de componentes produzidos, mantendo a temperatura estável ao longo do tempo de armazenamento, e dadas as suas dimensões, essa estabilidade mantém-se independentemente do volume de carga de novos componentes.

Atendendo às características próprias deste componente pretende-se a preservação máxima dos fatores de coagulação mais lábeis, como é o caso do Fator VIII, sabendo que o consumo dos fatores tem início na própria colheita e é facilitado pelas temperaturas de acondicionamento, não só durante o transporte e armazenamento, mas durante o próprio processo de congelação.

Este processo está descrito como devendo ocorrer em condições controladas que permitam preservar ao máximo a quantidade de fatores de coagulação e a sua estrutura qualitativa.^[28]

II. Estágio

1. Instituto Português do Sangue

O Instituto Português do Sangue (IPS) é um organismo dependente diretamente do Ministério da Saúde e que tem por missão regular, a nível nacional, a atividade da medicina transfusional. Deve ainda garantir a disponibilidade e acessibilidade de sangue e componentes sanguíneos de qualidade, seguros e eficazes a todas as instituições de saúde que integrem o Serviço Nacional de Saúde.

1.1. Breve História da Instituição

Portugal delineou os primeiros contornos da estrutura da rede transfusional nacional em 1958 aquando da criação do então designado Instituto Nacional de Sangue. Mais tarde, já na década de 80, com a emergência de doenças até então desconhecidas e transmissíveis por transfusão sanguínea, surge a necessidade de reestruturar a nível nacional, toda a rede da medicina transfusional com definição clara de autoridades e responsabilidades, assim como do papel de regulador agora atribuído à entidade competente. Em consequência, a 21 de setembro de 1990, o Decreto-Lei nº294/90 cria o IPS, dotando-o como organização com as competências e atribuições específicas para esta atividade. Caracterizando-se como uma instituição com autonomia financeira e técnica, e administrativamente dependente do Ministério da Saúde, o IPS é até hoje o principal constituinte do Sistema Português do Sangue e da rede transfusional.

Mais recentemente, esta instituição junta a área dos transplantes, passando a ter nas suas responsabilidades, atribuições e competências em toda a atividade relacionada com a transplantação.

1.2. Instalações

O IPS é uma rede integrada de serviços que se distribuem por três Centros Regionais de Sangue (CRS) localizados no Porto, Coimbra e Lisboa (Figura 1), responsáveis pela maioria das colheitas de sangue no país, com capacidade para assegurar a disponibilização e distribuição de componentes sanguíneos a hospitais, clínicas e centros de hemodiálise, públicos ou privados, que integram o Serviço Nacional de Saúde, sendo as dádivas voluntárias e não remuneradas. ^[29]

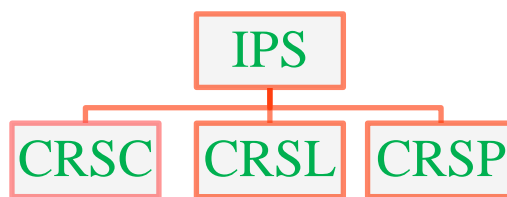


Figura 1. Organização nacional do IPS

1.3. Atividade e Atribuições

Ao IPS cabe:

“- Coordenar e orientar a nível nacional todas as atividades relacionadas com a transfusão de sangue desde a colheita à administração;

- Assegurar o funcionamento do Sistema Nacional de Hemovigilância em articulação com as entidades nacionais e internacionais competentes;

- Promover e apoiar a investigação nos domínios da ciência e tecnologia da área da medicina transfusional;

- Promover a dádiva de sangue;

- Acompanhar os serviços de medicina transfusional públicos e privados, integrados no Sistema Nacional de Saúde, a fim de garantir o cumprimento das diretrizes aplicáveis;

- *Desenvolver um serviço nacional de referência na área da medicina transfusional;*
- *Assegurar, no âmbito das suas atribuições, o cumprimento das obrigações internacionais do Estado e a representação do País, designadamente junto da União Europeia, do Conselho da Europa, da Organização Mundial de Saúde e de outras organizações públicas ou privadas.”*

Dentro da missão do IPS e sua instrumentalização através dos centros regionais, o CRSP, tem “a responsabilidade de garantir a qualidade e segurança dos componentes do sangue”.

1.4. Centro Regional de Sangue do Porto

O CRSP, local onde teve lugar o estágio, é o centro de colheita, processamento, armazenamento e distribuição de componentes sanguíneos da região Norte. Possui também unidades móveis de colheita que usa para a promoção da dádiva (Figura 2). O CRSP faz parte da rede nacional do IPS e é responsável pelo aprovisionamento, e reserva de componentes sanguíneos para as instituições hospitalares com objetivo principal de salvar e melhorar a vida dos doentes.



Figura 2. *Unidade móvel de colheitas junto ao edifício do CRSP*

Neste contexto, o CRSP considera fundamental:

- Disponibilizar, de forma consistente e sustentada, produtos e serviços seguros e eficazes, que cumpram os requisitos técnicos e legais aplicáveis à medicina transfusional. Para isto constitui relações fortes com os dadores e clientes, mantendo um relacionamento exigente e justo para com os dadores, fornecedores da matéria-prima, pois este é o primeiro e mais importante elo da segurança na cadeia transfusional.
- O CRSP compromete-se ainda a avaliar sistematicamente a satisfação dos clientes e dadores de sangue, o desempenho do Sistema de Gestão da Qualidade assim como a eficácia dos processos empregues pela organização, tendo em vista a constante procura e implementação de ações de melhoria.
- Pretende ainda responder permanente e adequadamente às exigências da inovação científica e tecnológica e às necessidades dos doentes desenvolvendo e disponibilizando mais e melhores produtos e serviços.
- Disponibilizar aos colaboradores os meios técnicos e a formação adequada com vista à manutenção de uma equipa técnica qualificada, competente e motivada.
- Materializar esta preocupação com os colaboradores e o ambiente de trabalho através da avaliação e implementação de ações no âmbito da higiene, saúde e segurança.
- Desenvolver ações para proteger e conservar o meio ambiente.

O CRSP estabelece como sua missão fornecer em tempo útil produtos sanguíneos lábeis seguros e eficazes, aos serviços hospitalares da região norte, sem e com serviço de colheita, de acordo com as suas necessidades. Responde ainda às necessidades das outras áreas geográficas, sempre que lhe é possível.

Na sua visão pretende ser o Centro de Referência da Zona Norte, nas áreas de:

- Imunohematologia;
- Doenças Transmissíveis pelo Sangue;
- Estabelecer o Banco de Células de Grupos Sanguíneos Raros Nacional.

Como valores, o CRSP empenha-se na conduta ética; confidencialidade; rigor técnico e transparência na comunicação.

O CRSP, como produtor e distribuidor de componentes sanguíneos da zona norte do país desde 1990, tem registado um aumento na distribuição, atingindo uma média anual de 80000 unidades por dois anos consecutivos, 2009 e 2010 (Figura 3).

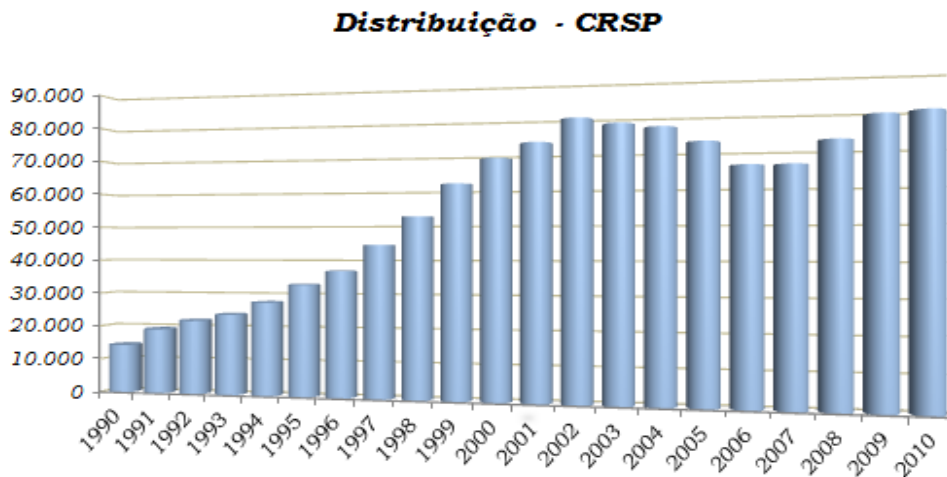


Figura 3. Evolução da distribuição de componentes sanguíneos pelo CRSP, entre 1990 e 2010

Já em 2010, o CRSP atingiu uma média anual de 85 000 colheitas de ST processadas (Figura 4), e 5000 produtos obtidos por aférese, com uma média diária que varia entre as 100 e as 600 unidades.

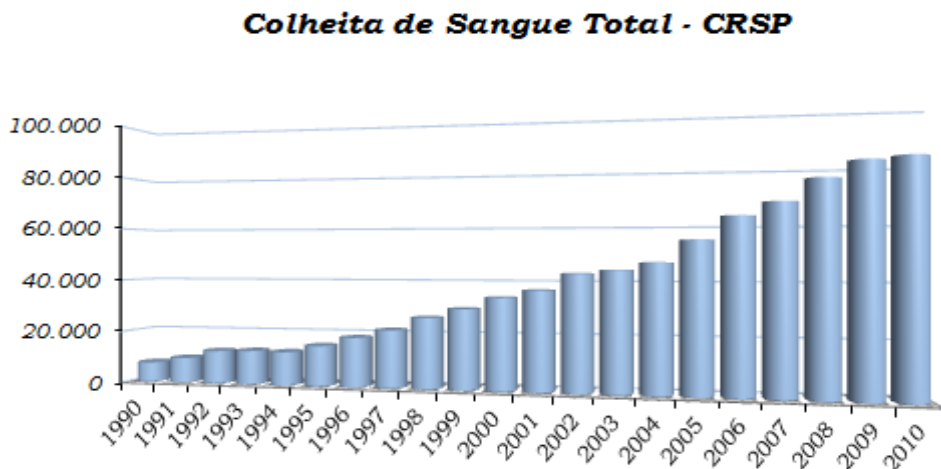


Figura 4. Evolução do número de dádivas de ST colhidas no CRSP de 1990 até 2010

A atividade do CRSP desenvolve-se através da realização de trabalho interno pelas atividades diretivas, administrativas, promocionais, laboratoriais e de colheita de sangue no posto fixo, mas também por trabalho externo, na atividade de colheita em brigadas móveis e respetivas atividades de suporte. Os setores de atividade congregam-se para o mesmo objetivo: assegurar componentes sanguíneos finais que sejam eficazes do ponto de vista terapêutico, seguros e com garantia da qualidade, zelando pela sua correta administração.

A organização do CRSP está demonstrada na Figura 5:

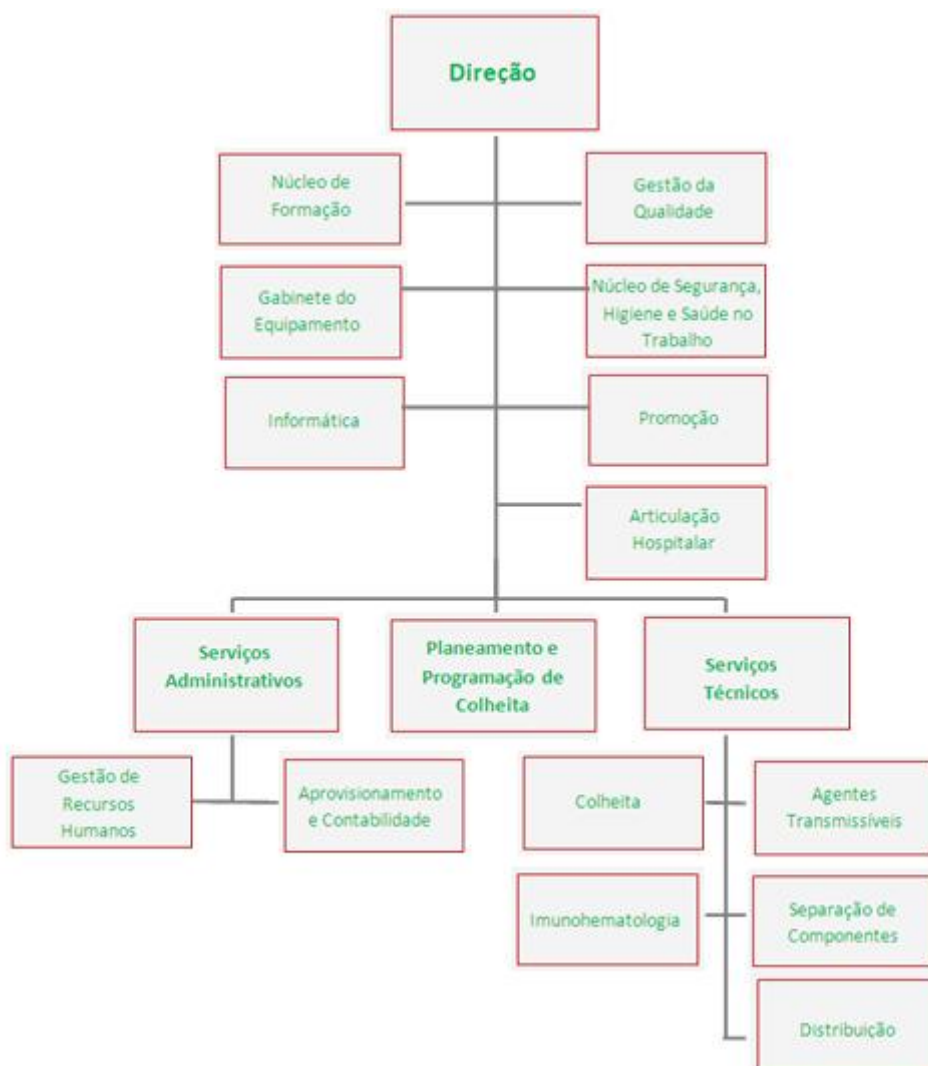


Figura 5. Organização do CRSP nos vários departamentos internos

No CRSP destacam-se as seguintes atividades e estruturas pela sua especificidade:

- **Promoção da dádiva:** sensibilização, por contacto direto da população potencialmente dadora de sangue (escolas, empresas, paróquias, associações, coletividades, instituições públicas, etc...) e por contacto indireto, através dos meios de comunicação social e outros.
- **Colheita de sangue a dadores:** colher ST ou componentes sanguíneos específicos, em posto fixo ou móvel, segundo procedimentos claramente definidos.
- **Processamento de componentes sanguíneos:** envolve, sucintamente, a separação de ST em componentes sanguíneos, a desleucocitação, o controlo de qualidade dos componentes, a rotulagem, seu controlo, armazenamento e distribuição.
- **Laboratório de Imunohematologia:** estudo de antigénios ou anticorpos eritrocitários e/ou plaquetários, quer em dadores, quer em doentes.
- **Laboratório de Agentes Transmissíveis:** rastreio e confirmação de doenças transmitidas pelo sangue, quer em dadores, quer em doentes.
- **Distribuição e receção:** gestão dos pedidos e distribuição de componentes nas instituições de saúde públicas e privadas da Região Norte de Saúde.
- **Consultoria Médica:** apoio a solicitações técnicas das diversas instituições públicas e privadas com as quais se relaciona.
- **Articulação Hospitalar:** elo de ligação entre o CRSP, e as diversas instituições públicas e privadas com as quais se relaciona.

Todas estas atividades estão organizadas em quatro processos claramente definidos: os processos de gestão que englobam a conceção e desenvolvimento, o planeamento e revisão do sistema de gestão da qualidade, a gestão de recursos humanos e a articulação hospitalar; os processos de melhoria que englobam o tratamento de não conformidades, ações corretivas e preventivas assim como as auditorias; os processos de realização que englobam o planeamento, programação de colheitas, o processamento das dádivas com as diferentes vertentes laboratoriais, como os laboratórios de virologia, imunohematologia e preparação, armazenamento, distribuição e transporte dos componentes, e finalmente, os processos de apoio como compras, gestão de infraestruturas, tecnologias de

informação e comunicação, e gestão de segurança, emergência e ambiente cujo mapeamento se apresenta na figura seguinte:

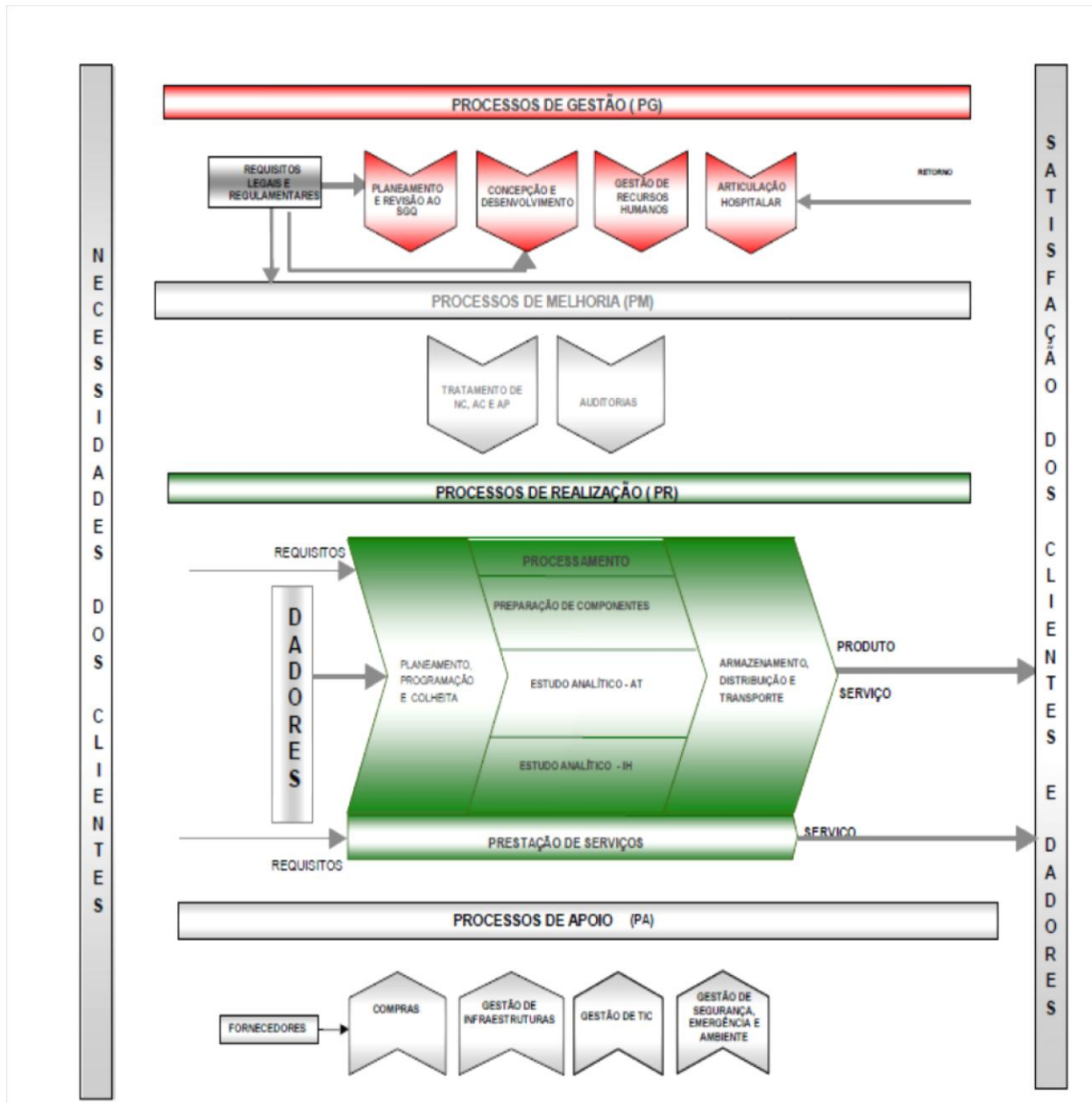


Figura 6. Distribuição das atividades do CRSP por quatro tipos de processos relacionados com a gestão, melhoria, realização e apoio dos serviços prestados.

Todas estas atribuições de competências a nível interno, aliadas às exigências das diretivas europeias, que hoje são parte integrante do dia-a-dia da atividade do CRSP, não lhe permitem acomodar-se, mas tentar responder cada vez melhor a todos os requisitos cabendo-lhe a definição do seu modo de cumprimento. Este é outro desafio, pois o quadro económico do país obriga a mais criatividade para alcançar os mesmos objetivos com menos, mas mantendo a segurança e qualidade.

É neste espírito que o laboratório de Produtos Sanguíneos Lábeis (PSL), responsável pela produção de componentes sanguíneos, controlo de qualidade e armazenamento, tem intrínseca à sua rotina de trabalho a integração de forma permanente de inovação na busca de metodologias para responder adequadamente a exigências e mudanças.

2. Laboratório PSL

Provido de tecnologia e recursos humanos especializados, o CRSP assume assim competências na colheita, processamento e conservação de sangue e componentes. Em coerência com a sua política de inovação científica e tecnológica, o laboratório de PSL deste centro desenvolveu um processador automático das unidades de ST, o Atreus 3C, para a separação diferencial dos vários componentes sanguíneos. Desta forma garante a obtenção de componentes sanguíneos de qualidade e elevada pureza e estabilidade na sua constituição, apesar da variabilidade biológica da matéria-prima, pois cada dador tem características biológicas únicas. É de referir que as práticas utilizadas no processamento do sangue total em componentes devem prevenir alterações físicas e químicas prejudiciais aos componentes sanguíneos, assim como minimizar a contaminação e proliferação microbiana

Este desenvolvimento teve início em 2003 com o processador automático para a preparação de *pools* de plaquetas a partir de *buffy-coats*, o ORBISAC, dois anos mais tarde, o CRSP em parceria com a Caridian BCT[®], detentora deste equipamento, desenvolveu um conceito que permitiu, a partir desta plataforma, migrar para um equipamento de processamento completamente automatizado de processamento de ST e obtenção de CE, plasma desleucocitado e *buffy-coat*, o ATREUS 2C+.

Dentro do espírito de desenvolvimento contínuo e de permanente melhoria para otimizar a resposta, não só em qualidade como em quantidade de componentes de sangue, este novo equipamento evoluiu para uma outra plataforma, o ATREUS 3C, que permitia obter além de CE, plasma desleucocitado, plaquetas hiperconcentradas e um resíduo rico em células mononucleares, extraído dos outros componentes como elemento indesejável, mas ainda com aplicação clínica em situações muito específicas.

Em simultâneo, desenvolveu uma ferramenta informática que permite obter os dados relacionados com os requisitos de qualidade de cada unidade de ST aí processada, assim como dos componentes obtidos e a rastreabilidade de cada unidade de ST.

Paralelamente, nestes últimos dois anos, esta plataforma, ainda em parceria, já evoluiu para uma outra plataforma que permite o processamento de 4 unidades de ST em lugar de uma única unidade, como atualmente, esperando-se a sua comercialização para o final de 2012, o REVEOS[®], agora já Terumo BCT.

Tal como o processamento, também o armazenamento e conservação dos hemocomponentes são fundamentais na garantia de segurança transfusional. Com esse intuito, o CRSP possui duas arcas de congelação a -80°C e duas câmaras de frio a -40°C para PFC e Crio, duas câmaras a 4°C, uma, para CE congelado, outra para reagentes e *back-up* de armazenamento de CE e duas câmaras a 22°C para CP.

Anterior ao processamento do ST pelo laboratório PSL, a obtenção da unidade de sangue total está também sujeita a um processo completo de controlo nas suas diferentes etapas: seleção do dador, controlo de contaminação, de volume e velocidade da colheita, controlo de temperatura de acondicionamento e transporte das unidades de ST até ao centro de processamento ou seja, o laboratório PSL do CRSP.

O desenho e controlo do processo de colheita pretendem garantir de forma consistente a qualidade da matéria-prima, para permitir a obtenção de componentes que também tenham condições de responder de forma igualmente consistente aos requisitos de qualidade exigidos. Para além dessa preocupação, também se pretende cumprir com os compromissos assumidos pelo CRSP face aos seus fornecedores,

dadores, ou seja, não desperdiçar a matéria-prima que é dada pelos cidadãos, devido a disfunções inerentes ao processo de colheita.

É portanto essencial a utilização de técnicas e métodos adequados para garantir os melhores resultados, tanto para o dador como para o doente, tendo sempre presentes os princípios de qualidade, segurança e zero desperdício.

3. Competências e Objetivos

O estágio realizado no laboratório PSL pretende promover competências na gestão e organização das tarefas de rotina do laboratório PSL, na conceção e desenvolvimento de protocolos para responder a necessidades específicas da rotina e na execução de técnicas laboratoriais como a citometria de fluxo e a operação com os processadores automáticos de ST para obtenção dos componentes sanguíneos.

Para integrar na rotina do laboratório PSL, foi crítico obter conhecimentos não só sobre as características de cada um dos componentes obtidos a partir do ST como algumas das suas principais aplicações clínicas.

Para além das competências técnicas, também as interpessoais foram exploradas aquando da integração numa equipa de trabalho já formada, e com o conhecimento das hierarquias da instituição.

Os objetivos principais definidos para este estágio foram:

- Compreensão dos princípios básicos da separação e conservação dos componentes sanguíneos;
- Integração na rotina laboratorial;
- Compreensão dos processos de gestão e distribuição dos produtos sanguíneos;
- Validação da qualidade dos criocomponentes produzidos no CRSP.

4. Atividades Desenvolvidas

As atividades desenvolvidas durante o estágio incluíram participação nas seguintes tarefas:

- Rotina do processamento de unidades de ST numa metodologia automática;
- Controlo da qualidade das condições de criopreservação disponível no CRSP;
- Controlo da qualidade dos plasmas obtidos no processamento das unidades de ST e após sua transformação em crio concentrados (PFC e Crio).

Foi concedido o acesso à tecnologia disponível na instituição, desde os equipamentos de centrifugação diferencial, Atreus 3C, à citometria de fluxo para efetuar contagem celular e coagulometria para doseamento de fatores de coagulação, até ao *software* utilizado para gerir as informações dos componentes sanguíneos.

As atividades realizadas foram as seguintes: sessão de acolhimento sob a responsabilidade do chefe de equipa, e integração nas áreas do laboratório PSL; observação das colheitas das dádivas; processamento das unidades de ST, que inclui programação e manutenção do Atreus 3C e desleucocitação dos CE; transporte dos CE e plasma para locais especializados de conservação e armazenamento; armazenamento dos CP em agitadores; observação da fase de distribuição dos componentes; ensaio para avaliação dos equipamentos de criopreservação para armazenamento de PFC e Crio; ensaio de controlo de qualidade dos plasmas, PFC e Crio, por doseamento de fatores de coagulação e células residuais, com recurso a citometria de fluxo e coagulometria.

Segue-se o cronograma com a calendarização sumária das tarefas do estágio:

Produtos Sanguíneos Lábeis

Estágio no Laboratório PSL do CRSP	SEMANAS													MESES				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	Julho de 2011 a Setembro de 2012				
Tarefas	02/02 a 04/02	07/02 a 11/02	14/02 a 18/02	21/02 a 25/02	28/02 a 04/03	07/03 a 11/03	14/03 a 18/03	21/03 a 25/03	28/03 a 01/04	04/04 a 08/04	11/04 a 15/04	25/04 a 29/04	27/06 a 01/07					
Pesquisa e estudo bibliográfico																		
Integrar a rotina - processamento de ST																		
Avaliação das condições de criopreservação do CRSP																		
Avaliação da qualidade dos PFC																		
Elaboração do índice do relatório de estágio																		
Elaboração do relatório de estágio																		

Figura 7. Calendarização do estágio no CRSP

4.1. Processamento das unidades de sangue total

A separação de ST em diferentes frações celulares é conseguida através da centrifugação diferencial, na qual a força de aceleração é ajustada de modo a provocar a sedimentação de determinado tipo de células, enquanto as restantes se mantêm em suspensão. Variáveis como a viscosidade do sangue, densidade e tamanho das células, a concentração celular e a força da gravidade são calculadas e reguladas para que numa única centrifugação (variando a intensidade e velocidade) se obtenham vários componentes sanguíneos.

Existe uma grande variedade de sistemas semi automatizados especificamente concebidos para a separação de ST em componentes sanguíneos, que combinam a centrifugação com selagem e pesagem dos componentes obtidos, eliminando algumas das tarefas manuais necessárias anteriormente.

Como já foi referido, o CRSP, dentro do seu compromisso de inovação, e em parceria com uma empresa multinacional, Caridian BCT, desenvolveu um sistema totalmente automático de obtenção de componentes do ST definido como Atreus (Figura 8).



Figura 8. Sistema Atreus 3C, processador automático de ST desenvolvido e utilizado no CRSP

Este sistema, além da estabilidade e robustez que introduziu neste processo, também foi concebido a pensar na adequabilidade à rotina de colheita e obtenção de componentes a partir de ST (Figura 9) possibilitando a sua separação desde as 2 e as 24 horas após a colheita.

Esta última particularidade foi outra inovação que constitui uma mais-valia adicional, pois num processo de obtenção de componentes tradicional é necessário um repouso das unidades de ST no mínimo de 8 a 12 horas antes do processamento para obtenção de componentes com as concentrações celulares necessárias à eficácia terapêutica.



Figura 9. Unidade de ST rotulada e pronta a processar no Atreus 3C

Com a introdução desta flexibilidade de tempo para dar início à preparação dos componentes, é possível uma gestão muito mais eficiente dos recursos, sem

necessitar de dispor de *stocks* de componentes, e assim aumentar consideravelmente a capacidade de resposta, visto que a manutenção dos produtos em *stock* com validades curtas e perda de viabilidade celular não é o mais desejável, e tem que se distribuir os mais antigos (e por isso menos eficazes e com mais reações secundárias) primeiro e depois os mais recentes.

A obtenção de componentes com esta tecnologia completamente automatizada simplifica de forma muito significativa o processo de produção e elimina a variabilidade introduzida pelo operador, que se verifica de forma muito acentuada nos processos manuais.

Assim, após a obtenção da unidade de ST, é feita a carga informática no próprio equipamento (Figura 10), que foi parametrizado para iniciar o procedimento unicamente após a identificação do operador, da unidade e do grupo sanguíneo, e tendo sido atribuído um código para as primeiras dádivas que não apresentam grupo sanguíneo ainda disponível.



Figura 10. Identificação da unidade de ST, no software do Atreus 3C

É então selecionado o protocolo de separação de acordo com os componentes que são pretendidos no momento. A Figura 10 exemplifica o procedimento de identificação onde foi selecionado o protocolo “FB BOAS PLT” que permite o processamento de ST colhido há menos de 8 horas para obtenção de CP com alta concentração celular.

Para uma melhor resposta às necessidades dos hospitais em componentes, e simultaneamente à logística das próprias colheitas, o laboratório de PSL elaborou 6 protocolos. Três protocolos para unidades de ST colhidas há mais de 8 horas que possibilitam separar até às 24 horas após colheita: um em que todas as unidades de ST são para obtenção de plaquetas, outro para obtenção CE e plasma sem CP, e outro com a aplicação de um *autoswitch*. Esta aplicação ocorre quando o próprio equipamento deteta a camada leucoplaquetária, e em função da sua espessura, determina quais as unidades que possibilitam a obtenção de plaquetas com alta concentração celular, das unidades que não o permitem, selecionando-as automaticamente. Os outros três protocolos permitem os mesmos resultados, ou seja a obtenção do mesmo tipo de produtos e com as mesmas características, mas em unidades de sangue colhidas há mais de 2 horas e menos de 8 horas.

O protocolo selecionado na Figura 10, “FB BOAS PLT”, é precisamente um protocolo com a aplicação do *autoswitch* aplicado a sangue que foi colhido há menos de 8 horas. Após a identificação da unidade de ST e seleção do protocolo de separação, deve-se proceder à carga do Atreus 3C, como mostra a Figura 11, com a unidade e respetivos sacos múltiplos, para transferência com os componentes separados. A posição de carga da unidade de ST tem apenas uma posição de encaixe, e no final do procedimento obtêm-se os componentes automaticamente selecionados pelo equipamento, CE, plaquetas concentradas e plasma isento de células.

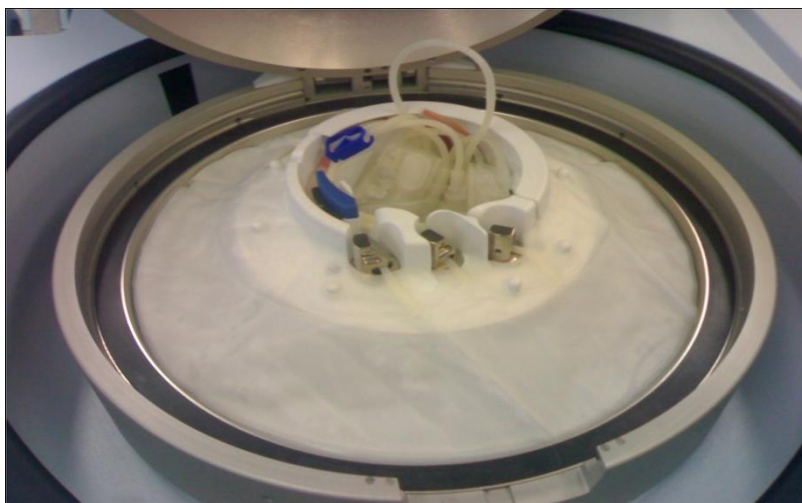


Figura 11. Carga do equipamento com a unidade de ST

No final do ciclo, no caso do protocolo “FB BOAS PLT” com a duração de aproximadamente 10 minutos, basta proceder á descarga do equipamento. Como mostra a Figura 12, a descarga é manual e deve ser feita com cuidado.

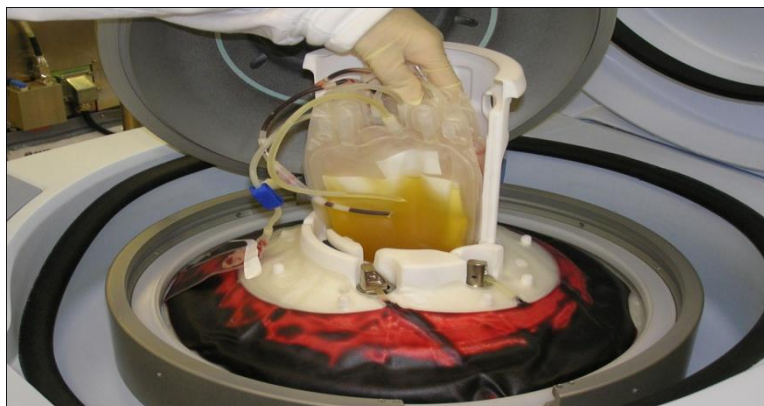


Figura 12. Descarga dos produtos da separação, transferidos do saco principal de colheita da unidade de ST, para os sacos satélites

Na Figura 13 vemos os componentes sanguíneos separados e selados em sacos individuais, prontos para armazenamento, conservação e administração.

Após separação, apenas os glóbulos rubros necessitam de filtração por gravidade, como é mostrado na Figura 14, para desleucocitação, procedimento obrigatório desde 1999.



Figura 13. Produtos sanguíneos obtidos de uma única dádiva de ST

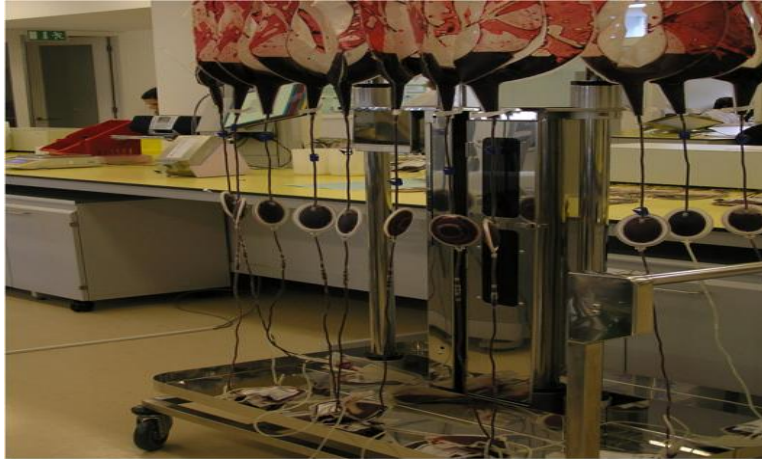


Figura 14. Filtração dos CE por gravidade, para desleucocitação

No final do processo, o display do equipamento evidencia as características mais relevantes de cada componente. A Figura 15 exemplifica o display final dum ciclo de separação, neste caso o protocolo aplicado é o de preparação de ST que foi colhido há mais de 8 horas sem aplicação de *autoswitch*, isto é, todas estas unidades serão processadas em plaquetas. Pode ver-se o número de colheita, o volume do ST, do plasma, do CP e do CE.

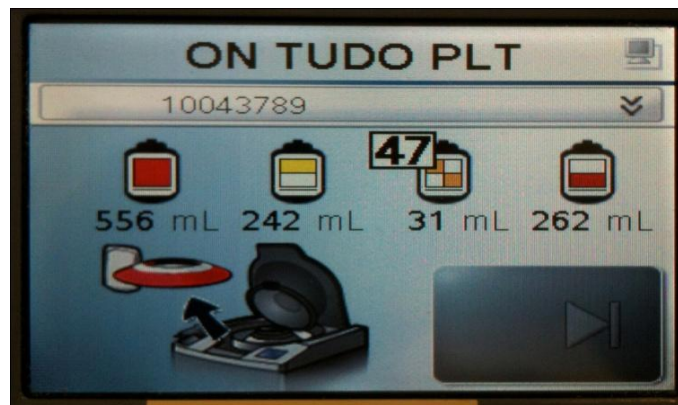


Figura 15. Display do final do Atrius C, após a separação do ST com as características de cada componente

Pode ainda ver-se, para além da identificação da colheita, o número 47 no ícone que ilustra a unidade de plaquetas concentradas, este número corresponde ao *Platelet Yield Index* (PYI), que é um índice de concentrações celulares indicador da concentração de plaquetas desta unidade.

Este índice sempre que se situe acima de 40 indica um concentrado de plaquetas com uma quantidade celular acima das 60×10^9 plaquetas na unidade.

Todos os dados relativos às unidades são armazenadas num servidor de forma a permitir a total rastreabilidade de cada componente, equipamento e/ou operador, assim como as características de cada unidade e dos componentes a que deu origem, passando também pela taxa de ocupação do equipamento e controlo e monitorização de erros.

Os dados armazenados no servidor são acessíveis através do *software* ASM@Porto (Figura 16), com várias opções de pesquisa e caracterização das unidades processadas no CRSP, permitindo uma gestão integrada de pessoas, equipamentos e produtos.



Figura 16. *Página inicial do software ASM@Porto, para rastreabilidade das unidades*

Todas as unidades estão registadas no sistema informático, e sempre que necessário, é possível saber: o número de serie que lhe foi atribuído, o lote a que pertence, o protocolo de separação selecionado e o operador que o selecionou, a data de processamento, o volume dos componentes obtidos após separação e a ocorrência de erros durante o processo, entre outros dados, como é demonstrado nas figuras 17 e 18.

Figura 17. Menu de pesquisa de informações sobre unidades processadas, do ASM@Porto

Na Figura 17 observamos os vários campos de preenchimento para rastreio das dádivas, que após serem definidos, dão origem a um conjunto de dados específicos que permitem identificar a unidade pesquisada e os vários detalhes do seu processamento, o que é demonstrado na Figura 18.

Unidade	Lote	Operador	Atreus	Protocolo	Data e Hora	Duração	Grupo	PVI	Vol PFC	Vol CE	Vol ST Hb	Alarme	
11049870	0003T51021	FERNANDO	APA.0975,PSL	ON SEM PLQ 2	2011-06-06 08:49	03'31"	???	0	0	77	-63	0	1505
11049873	0003T51021	FERNANDO	APA.0976,PSL	ON SEM PLQ 2	2011-06-06 08:50	09'43"	???	42	287	285	458	52	-
11050021	0003T51021	FERNANDO	APA.0977,PSL	ON SEM PLQ 2	2011-06-06 08:51	09'46"	???	54	304	273	462	49	-
11049995	0003T51021	FERNANDO	115	ON SEM PLQ 2	2011-06-06 08:53	09'50"	???	57	254	349	487	71	-
11050006	0003T51021	FERNANDO	APA.0979,PSL	ON SEM PLQ 2	2011-06-06 08:55	09'55"	???	50	304	274	462	49	-
11049902	0003T51021	FERNANDO	APA.0980,PSL	ON SEM PLQ 2	2011-06-06 08:56	09'34"	???	54	283	287	454	53	1026
11049870	0003T51021	ISABEL	PA.0975,PSL	ON SEM PLQ 2	2011-06-06 08:57	02'43"	???	0	0	77	-63	0	1019

Figura 18. Resultados de pesquisa, evidenciando dados da gestão do processamento das unidades

As unidades processadas podem também ser agrupadas por datas de separação, como mostra a Figura 19, com pormenores adicionais do protocolo selecionado e média de tempo de atividade do Atreus 3C.

Separações entre datas		
Separações efectuadas entre 2011-05-08 e 2011-06-08		
Protocolo	N.º processos	Média de tempo
FB BOAS PLQ 2	2975	00:10:03
FB SEM PLQ 2	808	00:08:18
FB TUDO PLT 2	217	00:10:11
ON BOAS PLQ 2	2309	00:11:23
ON SEM PLQ 2	548	00:09:46
ON TUDO PLQ 2	20	00:11:37
<i>Total:</i>	6877	

Figura 19. Registo de processos de separação de ST, por data, e com registo de tempo de separação

Outro tipo de tratamento de dados é também o registo dos processos divididos pelos vários turnos da manhã, tarde e noite, exemplificado na Figura 20.

Separações por turno		
Hora	N.º processos	Processos do turno
Das 8h00 às 8h59	7	Manhã: 49
Das 9h00 às 9h59	22	
Das 10h00 às 10h59	20	
Das 11h00 às 11h59	0	Tarde: 42
Das 12h00 às 12h59	0	
Das 13h00 às 13h59	0	
Das 14h00 às 14h59	0	
Das 15h00 às 15h59	0	
Das 16h00 às 16h59	0	
Das 17h00 às 17h59	0	Noite: 135
Das 18h00 às 18h59	12	
Das 19h00 às 19h59	30	
Das 20h00 às 20h59	30	
Das 21h00 às 21h59	26	

Figura 20. Registo dos processos de separação por turno

É importante a variedade de dados disponíveis e armazenados no servidor, pois permite rastrear facilmente certa unidade ou agrupamento de unidades, mediante características muito específicas.

Após o processamento da dádiva no Atreus 3C, as características específicas de cada unidade primária e componentes obtidos são exportadas automaticamente do equipamento para o servidor. Dados como o volume de ST, volume e valor de hemoglobina do CE, PYI e volume de plasma, são tratados estatisticamente no programa informático, como mostra a Figura 21, fornecendo indicadores de qualidade da colheita e processos anteriores, realizados no CRSP.

Características das Unidades

Volumes, Hemoglobina, Hematócrito e PYI

Característica	Média	Mínimo	Máximo	Desvio Padrão	Moda	Mediana
Volume de Sangue Total	468.4	363	706	15.9	465	466
Volume de Concentrado de Eritrócitos	297.5	238	388	23	285	297
Hemoglobina no Concentrado de Eritrócitos	55.9	39	82	6.6	56	56
Platelet Yield Indicator	50	14	142	12.3	49	50
Volume de Plasma	267.8	163	482	24.4	267	268

Unidades de 2011-05-08
n = 6826

Unidades com hemoglobinas fora do intervalo de referência

Unidade	Hb	Alarme
11039394	71	
11040762	0	1028

Figura 21. Caracterização das unidades de ST, com registos de volume, concentração de hemoglobina e PYI

O ASM@ Porto regista também os erros ocorridos antes e durante o processamento das unidades no Atreus 3C, sejam falhas mecânicas ou erros humanos, agrupando-os por data, discriminando o número de ocorrências e a percentagem de processos em que ocorrem, como demonstra a Figura 22.

Erros

N.º de erros agrupados por tipo de erro e ordenados por frequência

Erro	Descrição	N.º de ocorrências	% do total de processos
1026	Alerta na extracção do IPU	8	0.53 %
1019	Falha/Alerta na configuração	8	0.53 %
1505	Falha no fecho da/Não se fechou a válvula de	6	0.4 %
1027	Alerta de pressão do procedimento	2	0.13 %
1401	Fuga detectada	1	0.07 %
1016	ID de operador inválida/não autorizada	1	0.07 %
1508	Falha na abertura da/Não se abriu a válvula de	1	0.07 %
1414	Botão de STOP activado	1	0.07 %
1025	Falha/Alerta na passagem do ST	1	0.07 %

N.º de erros agrupados por dia

Data de processamento	N.º processos	% erros
2011-06-06	6	3.06 %
2011-06-07	13	5.91 %
2011-06-08	10	10.31 %

Total: 29

Figura 22. Registo e descrição de erros ocorridos durante processamentos de ST no Atreus 3C

4.2. Avaliação das Condições de Crio conservação dos Componentes Plasmáticos

4.2.1. Introdução

O plasma é um componente sanguíneo com interesse terapêutico em quadros clínicos de défices de fatores de coagulação. Este componente pode ser obtido por centrifugação diferencial de colheitas de ST, ou por aférese.

No plasma obtido a partir de ST, a separação deve ocorrer entre as 6 horas e as 18 horas após colheita. Após o processamento, os plasmas são submetidos a arrefecimento rápido em placas de butanodiol que permitem manter a temperatura entre os 20°C e os 24°C, e nestas condições a congelação pode ser realizada até 24 horas após a colheita.

Para o plasma obtido por aférese, o processo de congelação deve ocorrer até as 6 horas após a colheita, exceto se arrefecido em placa de butanodiol entre 20 a 24°C.

Segundo o CEu, o processo de congelação dos plasmas deve constituir num choque de frio que permita atingir temperatura $\leq -30^{\circ}\text{C}$, no core do plasma, em 60 minutos.

A cadeia de frio do banco de sangue deve ser devidamente definida e especializada, de modo a não haver perda de componentes sanguíneos. Os equipamentos de congelação devem ter uma performance que responda às necessidades específicas dos componentes plasmáticos, assim, o choque de frio deve ter a capacidade de atingir as temperaturas negativas desejáveis num período de tempo curto. O choque de frio é influenciado por fatores como a temperatura dos plasmas quando são colocados no equipamento, o volume de carga introduzido, a frequência com que o equipamento é aberto, a sua capacidade de armazenamento, e também a própria fonte de energia elétrica utilizada. A importância da qualidade do choque de frio na congelação do plasma reside na prevenção da perda de atividade dos fatores de coagulação lábeis deste componente. [6,8]

Não dispondo o CRSP de equipamento específico para esta finalidade, e atendendo não só ao custo da sua aquisição, como à manutenção e condições de instalação, foi necessário avaliar a qualidade do choque de frio com os equipamentos disponíveis nas instalações deste centro regional, assim como as condições de armazenamento e o seu impacto na qualidade dos componentes plasmáticos.

Assim no decorrer deste estágio, estudaram-se e avaliaram-se estas condições tendo partido do pressuposto que a obtenção dos plasmas no equipamento ATREUS 3C, possibilita plasma isento de células e obtenção mais precoce deste componente do que nos métodos com separação manuais, e que limita os fatores de exposição que contribuem para a perda de fatores. Pensou-se assim que esta vantagem à partida poderia compensar um choque de frio com as condições tradicionalmente descritas na literatura, e em que os componentes plasmáticos na sua entrada no processo de congelação sofreram já uma perda significativa dos fatores de coagulação.

4.2.2. Objetivos

Este estudo teve como objetivos principais:

- Estudar e avaliar o choque de frio com os equipamentos disponíveis
- Estudo da curva de descida de temperatura no core dos plasmas colocados nos equipamentos de congelação e armazenamento disponíveis no CRSP.

Como objetivo específico definiu-se o seguinte parâmetro:

- Determinação do tempo de congelação e temperatura no core dos plasmas, a temperatura igual ou inferior a -30°C , após carga dos equipamentos de congelação com plasmas à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$), em todos os pontos medidos. (em condições reais de trabalho).

4.2.3. Material

4.2.3.1. Amostras

- Sacos de unidades com 200 ml de glicerol
- Plasmas obtidos de ST após processamento

4.2.3.2. Equipamentos

- Arca 0619.CRB (arca de congelação e armazenamento a -80°C)
- Câmara RF0030.PSL (câmara de armazenamento a -40°C)
- Equipamento de medição e monitorização PC *logger* 2100 TR0850.PSL com 8 sondas (calibrado pelo ISQ com o certificado de calibração CTEM2308//10 em 08 de junho de 2010)
- *Software Easyview* para interpretação e leitura de resultados

4.2.4. Métodos

4.2.4.1. Protocolo para Avaliação da Arca 0619.CRB

i) 1º Ensaio

Colocaram-se as 8 sondas (C1 a C8) do *data logger* mergulhadas individualmente, num volume de 200 ml de glicerol à temperatura ambiente, distribuídas por cada uma das prateleiras, conforme a Figura 23 e 24.

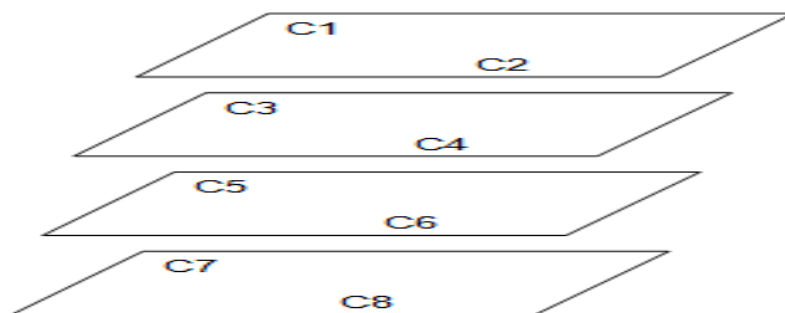


Figura 23. Disposição das sondas nas prateleiras da arca de congelação para o 1º ensaio

Após o fecho da arca, realizou-se o registo do valor das temperaturas captadas pelas 8 sondas, durante 24 horas.



Figura 24. Arca de congelação a -80°C , para conservação de criocomponentes no CRSP

ii) 2º Ensaio

Colocaram-se 8 sondas (C1 a C8) mergulhadas individualmente num volume de 200 ml de glicerol, paralelamente com 64 plasmas à temperatura ambiente, distribuídos pelas prateleiras da arca, conforme a Figura 25. Os 64 plasmas correspondem a um padrão de trabalho representativo do volume a processar na rotina do CRSP.

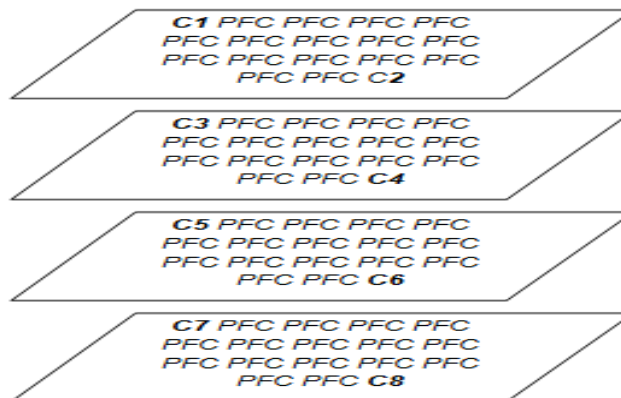


Figura 25. Disposição das sondas e PFC nas prateleiras da arca de congelação para o 2º ensaio

4.2.4.2. Protocolo para Avaliação da Câmara RF0030.PSL

i) 1º Ensaio

Colocaram-se 8 sondas (C1 a C8) mergulhadas individualmente num volume de 200 ml de glicerol à temperatura ambiente, cada uma colocada dentro de um cesto plástico. Os 8 cestos foram empilhados e distribuídos em pares (processo de acondicionamento utilizado na rotina de trabalho)

As sondas C1,3,5 e 7 foram colocadas nos cestos apoiados diretamente no chão da câmara, enquanto as sondas C2,4,6 e 8 foram colocadas nos cestos posicionados a cerca de 10 cm do chão conforme a Figura 26 e 27.

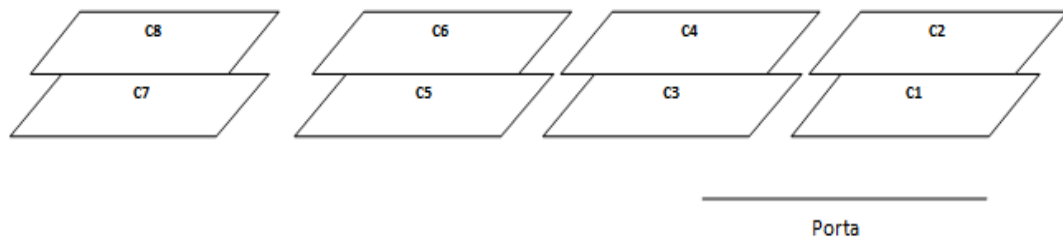


Figura 26. Disposição das 8 sondas em 8 cestos plásticos empilhados em pares, na câmara de congelação, para o 1º ensaio



Figura 27. PFC armazenados em cestos plásticos distribuídos aos pares no interior da câmara de congelação

Após o fecho da câmara, realizou-se o registo dos valores das temperaturas captadas pelas 8 sondas, durante 4,5 horas.

ii) 2º Ensaio

Colocaram-se 8 sondas mergulhadas individualmente em 200 ml de glicerol à temperatura ambiente, dispostas em 8 cestos plásticos empilhados aos pares.

As sondas C1,3,5 e 7 foram colocadas nos cestos junto ao chão. As sondas C2,4,6 e 8 foram colocadas nos cestos a cerca de 10 cm do chão. Juntamente com as sondas, foram colocados 54 plasmas igualmente à temperatura ambiente, conforme a Figura 28.

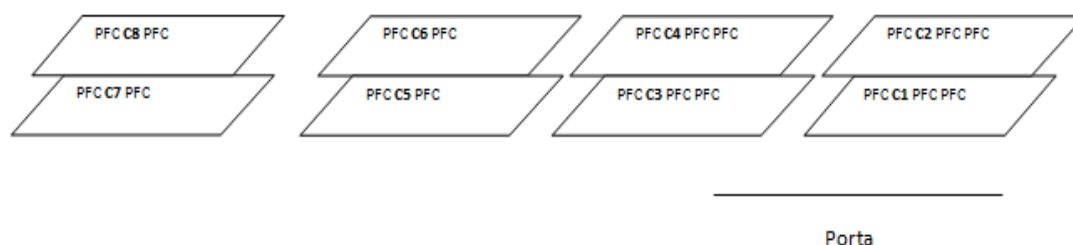


Figura 28. Disposição das 8 sondas e PFC em 8 cestos empilhados em pares, na câmara de congelação para o 2º ensaio

Após o fecho da câmara, realizou-se o registo dos valores das temperaturas captadas pelas 8 sondas, durante 24 horas.

4.2.5. Resultados

4.2.5.1. Arca 0619.CRB

i) 1º Ensaio

O teste foi realizado durante 24 horas e evidenciou comportamento análogo em todas as sondas. Verificou-se o tempo mínimo de 26-27 minutos para que as primeiras sondas atingissem -30 °C. Ao fim de 53 minutos a temperatura atingiu os -30°C pretendidos em todos os pontos (ver Tabela 2 e Anexo A).

Tabela 2. Resultados do 1º ensaio da Arca 0619.CRB

Sonda	Tempo de congelação a - 30°C (minutos)
C1	51
C2	53
C3	52
C4	53
C5	42
C6	47
C7	27
C8	26

ii) 2º Ensaio

O teste foi realizado durante 24 horas, com comportamentos distintos em todas as sondas. Ao fim de 507 minutos a temperatura atingiu os -30°C pretendidos em todos os pontos, sendo que o tempo mínimo observado foi de 220 minutos (ver Tabela 3 e Anexo B).

Tabela 3. Resultados do 2º ensaio da Arca 0619.CRB

Sonda	Tempo de congelação a - 30°C (minutos)
C1	220
C2	294
C3	277
C4	336
C5	399
C6	430
C7	478
C8	507

4.2.5.2. Câmara RF0030.PSL

i) 1º Ensaio

Foi realizado durante 4,5 horas e não se evidenciou comportamento idêntico em todas as sondas. Foi aos 90 minutos que a primeira sonda atingiu os -30 °C,

enquanto só ao fim de 3 horas a temperatura atingiu os -30°C pretendidos em todos os pontos (ver Tabela 4 e Anexo C).

Tabela 4. Resultados do 1º ensaio da Câmara RF0030.PSL

Sonda	Tempo de congelação a -30°C (minutos)
C1	178
C2	90
C3	112
C4	108
C5	94
C6	88
C7	99
C8	87

ii) 2º Ensaio

Foi realizado durante 24 horas e não se verificou comportamento idêntico em todas as sondas. O tempo mínimo atingido de congelação a -30°C foi de 135 minutos, no entanto só ao fim de 6 horas a temperatura atingiu os -30°C pretendidos em todos os pontos (ver Tabela 5 e Anexo D).

Tabela 5. Resultados do 2º ensaio da Câmara RF0030.PSL

Sonda	Tempo de congelação a -30°C (minutos)
C1	360
C2	150
C3	240
C4	150
C5	180
C6	150
C7	180
C8	135

4.2.6. Comentários

À luz das diretivas do CEu para a congelação (choque de frio) de componentes plasmáticos, assume-se que os equipamentos estudados não possuem capacidade de choque de frio que permita atingir os objetivos estipulados.

Perante os resultados apresentados, surge como opção justificável, a procura de outro tipo de congelação rápida de unidades de plasma, que corresponda aos requisitos pretendidos e permita garantir a qualidade do componente.

No entanto, para prevenir que investimentos consideráveis se revelem desnecessários ou redundantes no futuro próximo, seria pertinente completar este projeto com um estudo direto da qualidade dos componentes crioconservados por estes equipamentos do CRSP.

4.3. Avaliação dos Componentes Plasmáticos Obtidos a partir de Sangue Total

4.3.1. Introdução

O PFC e o Crio são fonte de fatores de coagulação para suporte transfusional em situações de coagulopatias e, particularmente, em situações de défices para os quais não existem concentrados de fator disponíveis.

O plasma é um componente sanguíneo que pode ser obtido a partir de uma colheita de ST ou por processo de colheita de aférese e denomina-se PFC quando é sujeito a congelamento a uma temperatura que permita a manutenção da sua qualidade enquanto componente destinado a transfusão.

Este componente deve ser constituído por fatores de coagulação, albumina e imunoglobulinas em valores considerados normais para a população em geral. Contudo, estão descritos certos critérios de seleção que devem ser seguidos, nas áreas da Serologia, Hemostase e Hematologia, como por exemplo, a ausência de certos marcadores víricos e de anticorpos irregulares e o seu método de preparação deve possibilitar a recuperação do Fator de Coagulação VIII dentro de níveis definidos assim como um número de células residuais dentro de limites estabelecidos. O cumprimento destes critérios garante a qualidade e eficácia clínica do PF.

No CRSP o processamento de plasma é obtido por aférese e por unidades de ST, refrigerado imediatamente após a colheita e acondicionado em placas de

butanodiol. O plasma é separado com recurso ao processador automático ATREUS 3C em intervalos de tempo entre as 2 e as 24 horas após colheita.

Após o processo de separação, a conservação do plasma deve ser feita por congelamento em sistemas que permitam atingir temperaturas inferiores a -30°C no intervalo de 1 hora. Se for armazenado entre $20-24^{\circ}\text{C}$, essas condições permitem um intervalo de 24 horas entre a colheita e o congelamento.

No processamento de plasma a partir de aférese, o componente desejado é retirado diretamente da circulação sanguínea do dador por sistema automatizado. As condições de congelamento devem ser as mesmas referidas anteriormente.

A validade dos PFC varia de 3 meses, a temperaturas entre -18°C a -25°C , a 3 anos, a temperaturas inferiores a -25°C .

Dentro deste contexto, o congelamento, armazenamento e descongelamento devem ser concebidos e selecionada uma metodologia que garanta os requisitos de qualidade do PF, assim como o conteúdo do PFC em fatores de coagulação e sua atividade funcional. O descongelamento do PFC deve ser feito em banho-maria, a temperaturas de cerca de 37°C e a metodologia definida de modo a evitar o risco de contaminação bacteriana. Sistemas de aquecimento em seco podem também ser aplicados, já que minimiza o risco de desnaturação das proteínas plasmáticas.

Quando o PFC sofre descongelamento a uma temperatura de cerca de 4°C , forma-se um crioprecipitado constituído por Fator VIII, Fibrinogénio, Fator Von Willebrand e Fator XIII, com cerca de 10 ml por unidade.

Este tipo de plasma descongelado em ambiente refrigerado, é utilizado para fracionamento comercial para a produção de produtos plasmáticos em *pools*.

Não se pode sujeitar o PF a mais de 1 ciclo de congelamento, com o risco de prejudicar a qualidade dos fatores de coagulação. ^[6,8]

Neste estudo, os PFC serão avaliados de acordo com os critérios de elegibilidade e aceitação/rejeição definidos pelo CEu, apresentados no Tabela 6:

Tabela 6. *Requisitos de qualidade de PFC definidos pelo CEu*

Parâmetro	Especificação
Fator VIIIc	Igual ou superior a 70% do valor do Plasma Fresco
Fibrinogênio	≥140 mg/U
Células Residuais	Glóbulos Rubros < 6,0x10 ⁹ /L
	Leucócitos < 1,0x10 ⁶ /U
	Plaquetas < 50x10 ⁹ /L

4.3.2. Objetivos

Este estudo teve como objetivo principal:

- Avaliação da qualidade dos plasmas obtidos por processamento de ST com Atreus 3C, após congelamento e armazenamento nas condições e instalações atuais do CRSP.

Como objetivos específicos definiram-se os seguintes parâmetros:

Plasmas Frescos (antes de congelação):

- Avaliação do número de células residuais;
- Avaliação da concentração de Fator VIII;
- Avaliação da concentração do Fibrinogênio.

Plasmas Frescos após congelamento a -40°C:

- Avaliação da concentração de Fator VIII;
- Avaliação da concentração do Fibrinogênio.

4.3.3. Material

4.3.3.1. Amostras

Plasmas obtidos por processamento de ST, com o equipamento automático ATREUS 3C, entre as 2 e as horas 24 horas após colheita com volumes compreendidos entre 217 e 321 mL. Crio resultantes de PFC colhidos e processados no CRSP.

4.3.3.2. Equipamentos

- Separador automático Atreus 3C
- Contador hematológico Coulter LH 750 Analyzer
- Citómetro de fluxo Cytomics FC 500 Beckman Coulter
- Coagulómetro Amelung Amax 190 Plus

4.3.4. Métodos

i) Protocolo para determinação do número de células residuais nos Plasmas Frescos

- **Caracterização da Amostra**

Os plasmas estudados foram obtidos a partir de colheitas *standard* de ST, realizadas na rotina do CRSP, e processados no separador automático ATREUS 3C.

Para a avaliação das células residuais dos Plasmas, utilizaram-se amostras de 35 PF processados entre 8 de fevereiro e 5 de março de 2011, a partir de colheitas de ST.

Os PF produzidos pelo CRSP têm um volume médio de 270 ± 17 mL. Os PF foram separados pelo sistema automatizado de processamento de ST Atreus®: 18 PF foram processados entre as 2 as 8 horas após colheita e 17 PF foram processados entre as 8 e 24 horas após colheita.

Os PF foram conservados a uma temperatura entre 20°C±2°C. Foram homogeneizados, e a amostra (3 a 5 mL) para a realização dos testes foi obtida por expressão da tubuladura, sendo este processo realizado 5 vezes.

- **Metodologia**

Os valores de leucócitos, eritrócitos e plaquetas foram determinados em contador hematológico Coulter LH 750 Analyzer®, que utiliza os princípios de impedância, frequência de rádio e dispersão de luz laser; e em citómetro de fluxo Cytomics FC 500 Beckman Coulter® por citometria de fluxo.

Para a contagem de células residuais em citómetro de fluxo utilizou-se o Plasma Count Kit BD Biosciences, seguindo as instruções do fabricante e calculando o valor final de células residuais utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{N^{\circ} \text{ células residuais}}{N^{\circ} \text{ esferas lidas}} \times \frac{\text{Esferas por Tubo BD}}{\text{Volume da Amostra}} = \text{Células Residuais}/\mu\text{L}$$

O número de esferas lidas foi constante para o grupo de Plasmas com separação entre 2 e 8 horas após colheita, no entanto para os Plasmas separados entre as 8 e as 24 horas o valor variou entre 10000 e 27994 esferas lidas pelo citómetro de fluxo. Esta variação relacionou-se com o facto de se ter verificado que 10000 esferas eram suficientes para validar o resultado, tendo-se optado por esta metodologia, dispensando a aquisição por tempo.

Foram utilizados anticorpos monoclonais antiglicoforina A (CD235a) para a marcação da sialoglicoproteína presente na membrana eritrocitária, e anticorpos anti-CD41a (complexo gIIa/IIIb) para a marcação de plaquetas. Para a marcação de leucócitos foi utilizado o corante de ácidos nucleicos Laranja de Tiazole, da BD Biosciences, Becton, Dickinson and Company.

Na metodologia de citometria de fluxo utilizada, é de referir que o *gate* apresentava, em todas as amostras, *debries* ou restos celulares que marcam para a glicoforina.

ii) Protocolo para determinação da concentração do Fator de Coagulação VIII nos PF e após congelamento a -40°C

• Caracterização da Amostra

Para determinar a concentração em Fator VIII dos Plasmas, utilizaram-se amostras de 24 PF processados entre 16 e 18 de fevereiro e 5 de março de 2011, a partir de colheitas de ST realizadas no CRSP. Os PF foram separados pelo sistema automatizado de processamento de ST Atreus®, entre as 8 e as 24 horas após colheita.

O volume médio dos PF foi de $264 \pm 29,19$ mL. Os PF foram sujeitos a congelamento em câmara de frio à temperatura de -40°C, e a descongelamento em banho-maria.

• Metodologia

O doseamento do Fator VIII foi efetuado nos PF, e após 24 horas de congelamento a -40°C. Foi utilizado o coagulómetro AMELUNG AMAX 190 Plus, pelo método de fotometria com substrato cromogénico, com o Kit Fator VIII Cromogenic Siemens Healthcare Diagnostics®, seguindo as instruções do fabricante.

iii) Protocolo para determinação da concentração do Fibrinogénio nos PF e Crio

• Caracterização da Amostra do PF

Para determinar a concentração em Fibrinogénio dos Plasmas, estudaram-se duas amostragens processadas com uma diferença de 3 anos, definindo-se assim o “estado da arte” dos componentes plasmáticos já disponíveis para distribuição. Utilizaram-se amostras de 6 PF processados entre 29 e 30 de março de 2011 e 6 PFC processados em 2008. Ambos os grupos foram processados a partir de

colheitas de ST realizadas no CRSP, e separados pela metodologia de processamento manual de *buffy-coat*, 24 horas após colheita. O volume médio dos PF foi de $278,83 \pm 15,98$ mL.

- **Caracterização da Amostra dos crioprecipitados**

Foram testadas amostras de 4 *pools* de 6 Crio, cada um produzido entre 22 e 30 de março de 2011, a partir do processamento de PFC realizado no CRSP. O volume por unidade de Crio foi de 0,35 dL.

Duas *pools* foram produzidas com o método de banho em etanol com descongelação durante 4 horas e as outras duas com o método em câmara a 4°C com descongelação em 12 horas.

- **Metodologia**

Foi utilizado o coagulómetro AMELUNG AMAX 190 Plus, pelo método de fotometria com substrato cromogénico, com o Kit DG-FIBL Human, Grifols Diagnostic® S.A., seguindo as instruções do fabricante.

4.3.5. Resultados

A avaliação da qualidade do plasma foi realizada não só após a congelação, mas também após o armazenamento.

Dos resultados obtidos na análise quer das células residuais quer das concentrações de fatores de coagulação pode-se verificar que a qualidade dos plasmas e Crio responde confortavelmente aos requisitos de qualidade estabelecidos pelo CEu, mesmo durante o armazenamento.

Como está demonstrado na Tabela 7, a média das células residuais situa-se da seguinte forma: $20,94 \pm 8,12 \times 10^9$ /L de plaquetas, $0,07 \pm 0,05 \times 10^9$ /L de leucócitos e zero eritrócitos para PF preparados até às 8 horas após a colheita; e de $9,06 \pm 5,06 \times 10^9$ /L de plaquetas, $0,08 \pm 0,04 \times 10^9$ /L de leucócitos e zero eritrócitos quando preparados até às 24 horas após a colheita.

Tabela 7. Contagem de células residuais em PFC, em contador automático

Amostras	Dados Estatísticos	Leucócitos (n° cél. x 10 ⁹ /L)	Eritrócitos (n° cél. x 10 ⁹ /L)	Plaquetas (n° cél. x 10 ⁹ /L)
18 PF separados 2-8 h após colheita	Total	1,2	0	377
	Média±dp	0,07±0,05	0	20,94±8,12
	Mínimo	0	0	10
	Máximo	0,1	0	43
17 PF separados 8-24 h após colheita	Total	1,3	0	154
	Média±dp	0,08±0,04	0	9,06±5,06
	Mínimo	0	0	0
	Máximo	0,1	0	17

Em ambos os cenários, PF obtidos entre as 2 e 8 horas após a colheita e nos obtidos entre as 8 e as 24 horas após a colheita, não foram verificadas situações ou valores fora dos critérios de aceitação em relação a nenhum dos parâmetros avaliados.

No entanto, em relação ao número de células residuais, verificou-se alguma distinção entre os dois grupos, sendo que as amostras sujeitas a separação entre 8 e 24 horas após colheita demonstraram maior número de eritrócitos e leucócitos e menor valor de plaquetas, comparativamente aos PF processados no intervalo de 2 a 8 horas após colheita. Dispondo deste processo automático de separação, a diferença de celularidade residual entre os dois intervalos de tempo para a preparação dos plasmas é muito pequena. O menor número de plaquetas nos plasmas com um período de repouso maior é um resultado esperado e está de acordo com o período de repouso que o método de separação tradicional exige antes do processamento, sob pena de não se conseguirem obter produtos celulares de qualidade e com possibilidade de inquinação celular dos plasmas obtidos.

Num processo de separação manual não seria possível obter plasmas com esta pureza. Por outro lado, esta separação mais precoce que o processo automático, permite a obtenção de plasmas com uma concentração de fatores mais elevada.

Tais valores obtidos em contador hematológico foram corroborados com um segundo ensaio confirmatório, recorrendo à citometria de fluxo, cujos resultados estão na Tabela 8. Contudo, é de referir que no ensaio por citometria de fluxo, o

valor para eritrócitos residuais não foi igual a zero, tal deve-se a uma maior sensibilidade e especificidade do método garantidas pela utilização de anticorpos monoclonais anti-glicoforina A (sialoglicoproteína presente na membrana eritrocitária), e simultaneamente, devido à presença no *gate* em questão, de restos celulares que marcam para a glicoforina, podendo atuar como interferência na contagem.

Tabela 8. Contagem de células residuais em PFC, por citómetro de fluxo

Amostras	Dados Estatísticos	Leucócitos (nº cél. x 10 ⁹ /L)	Eritrócitos (nº cél. x 10 ⁹ /L)	Plaquetas (nº cél. x 10 ⁹ /L)
18 PF separados 2-8 h após colheita	Total	2,30E+07	4,90E+07	4,60E+11
	Média±dp	3,0E+6±0,3	2,7E+6±2,4	2,6E+10±9,1E+9
	Mínimo	1,00E+05	6,10E+05	1,50E+10
	Máximo	3,90E+06	1,10E+07	5,20E+10
17 PF separados 8-24 h após colheita	Total	7,50E+06	1,10E+10	3,00E+11
	Média±dp	4,41E+5±0,1	5,9E+8±0,2E+10	1,8E+10±0,2E+11
	Mínimo	1,00E+05	6,10E+05	5,20E+09
	Máximo	1,20E+06	1,00E+10	9,20E+10

Os valores de Fator de Coagulação FVIII (FVIII) obtidos nos PF e PFCs foram muito próximos, como se pode observar na Tabela 9 e na Figura 29, e bastante mais elevados do que os valores mínimos espectáveis segundo o CE, como demonstra a Figura 30. Portanto, pode-se concluir que o processo de congelação protocolado pelo CRSP não provoca perdas significativas de FVIII (as perdas foram inferiores a 10%).

Tabela 9. Doseamento do FVIII em plasma, antes e pós congelamento

Amostras	Dados Estatísticos	FVIII (%) Pré-congelação	FVIII (%) Pós-congelação	Recuperação de FVIII (%)
24 PF separados 8-24 h após colheita	Média ±dp	108,6±17,5	100±15,9	92,17±3,1
	Mínimo	75	70	—
	Máximo	150	129	—

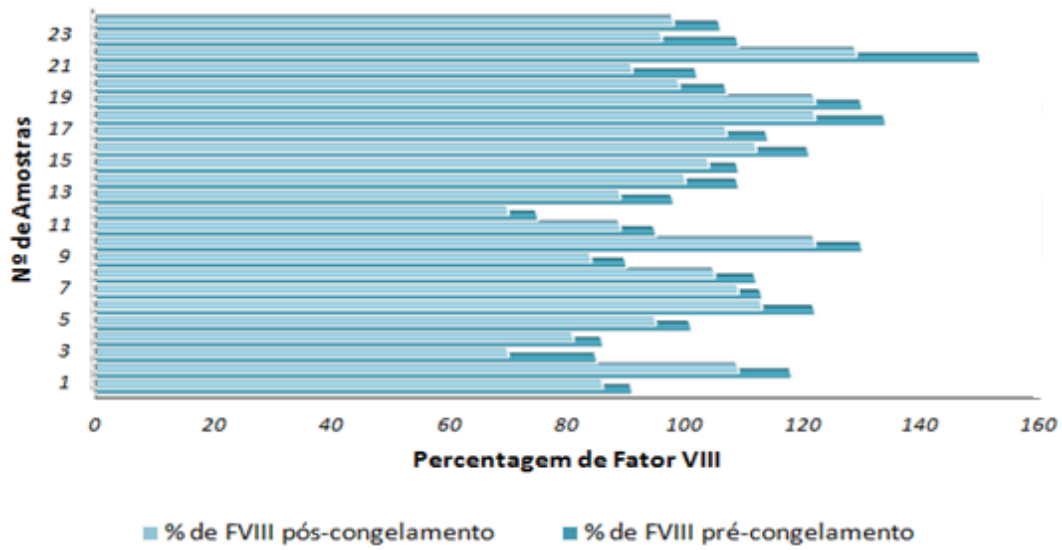


Figura 29. Comparação dos valores de FVIII nos plasmas antes e pós congelamento

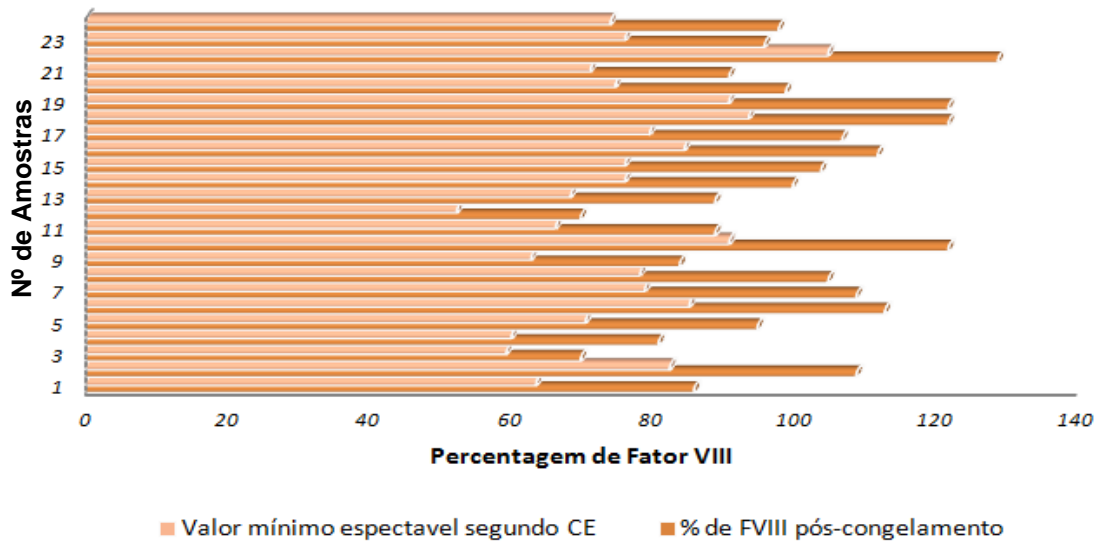


Figura 30. Comparação entre os valores de FVIII obtidos nos plasmas após congelamento, e os valores mínimos esperados, definidos pelo CEu

Os valores de fibrinogénio avaliados nos PFCs processados em 2008 pelo método de separação de *buffy coat* revelaram valores de fibrinogénio ligeiramente superiores aos dos PF separados no ano de 2011 (ver Tabela10), o que demonstra que mesmo com a utilização dum protocolo de qualidade técnica inferior (método *buffy coat*) e 3 anos de congelação, o CRSP obteve plasmas com qualidade terapêutica.

Tabela 10. Doseamento de Fibrinogénio em PF e PFC

Amostras	Dados Estatísticos	Fibrinogénio (mg/dL)
6 PF-2011 sep. por <i>Buffy-coat</i>	Média± dp	252±23
	Mínimo	234
	Máximo	296
6 PF-2008 sep. por <i>Buffy-coat</i>	Média± dp	275±30
	Mínimo	244
	Máximo	314

Também no âmbito dos Criocomponentes, os crioprecipitados demonstraram valores acima da média estipulada pelo CEu, confirmando a competência dos métodos de processamento e congelação do CRSP (Tabela 11).

Tabela 11. Doseamento de Fibrinogénio em Crio

Amostras	Dados Estatísticos	Fibrinogénio (mg/dL)
4 Pools de 6 Crioprecipitados	Média ±dp	819,2±266
	Mínimo	485
	Máximo	1134

4.3.6. Comentários

Apesar do CRSP não possuir câmara de congelação rápida, o presente estudo dos parâmetros de qualidade de PF e PFC demonstrou que as condições atuais de processamento e conservação dos Plasmas e Crio, aqui avaliadas, permitem obter componentes plasmáticos que respondem aos critérios de qualidade propostos pelo CEu. Apesar de o atual sistema de processamento dos componentes sanguíneos, o sistema Atrius, ser dos mais recentes tecnologicamente, é de referir que os métodos anteriores não deixam de ter a sua validade, e que a qualidade dos componentes é preservada.

III. Conclusões

Concluído o estágio, e considerando as competências e objetivos estabelecidos, pode-se apresentar o seguinte balanço:

Gestão e Organização de Tarefas na Integração em Equipa

A aquisição de competências na identificação das necessidades da rotina, e integração na organização das tarefas para responder a essas necessidades, sem comprometer em nenhum momento, a disponibilidade do *staff* e a dos componentes.

A aprendizagem da necessidade de conceber um modelo organizativo para integração na rotina, que contempla a identificação dos elementos do *staff* que levarão a cabo as tarefas, os respetivos tempos e calendarização; a gestão da utilização dos equipamentos com a preocupação de não prejudicar a sua utilização na resposta à rotina.

Conceção e desenvolvimento de protocolos

A capacidade de conceber um desenho de estudo que permita responder a uma competência específica para um *standard* ou exigência, mesmo que a disponibilidade de publicações sobre a matéria seja escassa, com informação muito reduzida ou até omissa sobre os detalhes dos protocolos ou procedimentos envolvidos.

O desenvolvimento de espírito crítico face a todos os *inputs* e *outputs* de cada processo, assim como as suas interfaces.

Execução de técnicas laboratoriais

A aquisição das competências para compreensão da importância da recolha de amostras dos componentes de sangue, representativas do conteúdo real do

componente, assim como o processamento técnico laboratorial necessário para a manutenção da sua qualidade terapêutica.

O trabalho com a citometria de fluxo na preparação e marcação da amostra, aquisição e interpretação de resultados com construção dos gates para leitura.

O trabalho com coagulometria com substratos cromogénicos, preparação da amostra e controlos.

Aquisição de conhecimentos e sua aplicação prática na rotina do laboratório PSL

A compreensão dos princípios do processamento dos produtos sanguíneos e a importância do rigor e qualidade da sua aplicação técnica na obtenção do produto final, com integração na totalidade da rotina laboratorial.

A percepção do valor de cada fase de processamento, e da função particular da conservação destes produtos, a manutenção da sua qualidade terapêutica.

A assimilação de conceitos e definições relacionadas com as práticas de produção de componentes sanguíneos.

A interpretação das práticas laboratoriais realizadas, à luz dos conhecimentos adquiridos.

A compreensão de que o desenho da logística do serviço é também definido em função das necessidades das instituições médicas da região norte (e não só), por observação da gestão e distribuição dos componentes sanguíneos produzidos.

Validações de Qualidade

A realização de dois ensaios de validação da qualidade dos criocomponentes produzidos:

- Em primeira instância, avaliando as condições de crio conservação disponíveis no CRSP e tendo como referência os requisitos especificados pelo CEu;

- Posteriormente, estudando as características celulares e bioquímicas dos componentes plasmáticos após o processamento e pré-congelação, e pós-congelação, tendo como referência os requisitos especificados pelo CEu.

Ambos os ensaios constituíram um estudo com resultados que permitiram a confirmação da qualidade dos componentes plasmáticos obtidos a partir de ST, e dos métodos desenvolvidos e utilizados no CRSP para o seu processamento e conservação.

Os objetivos definidos pelo CRSP de obtenção de componentes plasmáticos com qualidade terapêutica são indubitavelmente cumpridos, e em certas situações até ultrapassam os requisitos estipulados pelo CEu (no doseamento de fator de coagulação VIII pós-congelamento, ver gráfico 4), no entanto, o CRSP não possui o equipamento de choque de frio descrito como necessário.

Ao serem atingidos os objetivos estipulados com recurso aos meios de conservação disponíveis, mesmo que estes meios sejam considerados alternativos, e não completamente específicos para o fim que lhes é atribuído, torna-se desnecessária a aquisição de um equipamento que, para além do seu orçamento estar fora da realidade económica nacional, requer elevada manutenção e não apresenta garantias de resultados que excedam grandemente a qualidade dos obtidos.

Seria também um investimento desapropriado neste momento em que o tratamento industrial de plasma e sua inativação vão propor soluções cujos caminhos não estão ainda totalmente esclarecidos.

O que este estudo de qualidade reflete é, portanto, a importância máxima do raciocínio crítico na tomada de decisões, assim como a contribuição para as soluções que desbrava o caminho a seguir até aos objetivos.

A título de comentário pessoal, este estágio possibilitou:

A perceção da abertura de horizontes para a carreira profissional, compreensão e contato direto com uma realidade que ultrapassa a simples produção de resultados sobre uma amostra, mas que integra uma variedade de competências tão ampla como exige a produção de componentes sanguíneos.

A sensibilização para as potencialidades da área de Análises Clínicas e Saúde Pública, nesta realidade que também integra respostas específicas para doentes particulares, com componentes manufacturados e transformados exclusivamente

para responder a casos únicos e muito específicos. Ser analista implica conhecer a versatilidade necessária para conceber e determinar essas respostas.

Destaque-se:

A relevância significativa do estágio, em contexto de enriquecimento profissional e acadêmico, já que o profissional de Análises Clínicas e Saúde Pública necessita duma atualização constante, ou torna-se um simples autômato, facilmente substituível.

A constante procura de atualização de conhecimentos e divulgação de material didático entre os profissionais da instituição, observada por vários momentos no decorrer do estágio.

A percepção de que a atitude de permanente descoberta e evolução faz parte dum contexto de rotina com abrangência de atividades do técnico de Análises Clínicas e Saúde Pública.

O espírito de melhoria e inovação presenciado no laboratório PSL do CRSP, um serviço em que a rotina e a investigação se cruzam, um ambiente em que se prefere o ótimo ao bom, e fundamentalmente em que a componente humana da medicina não é esquecida.

IV. Bibliografia

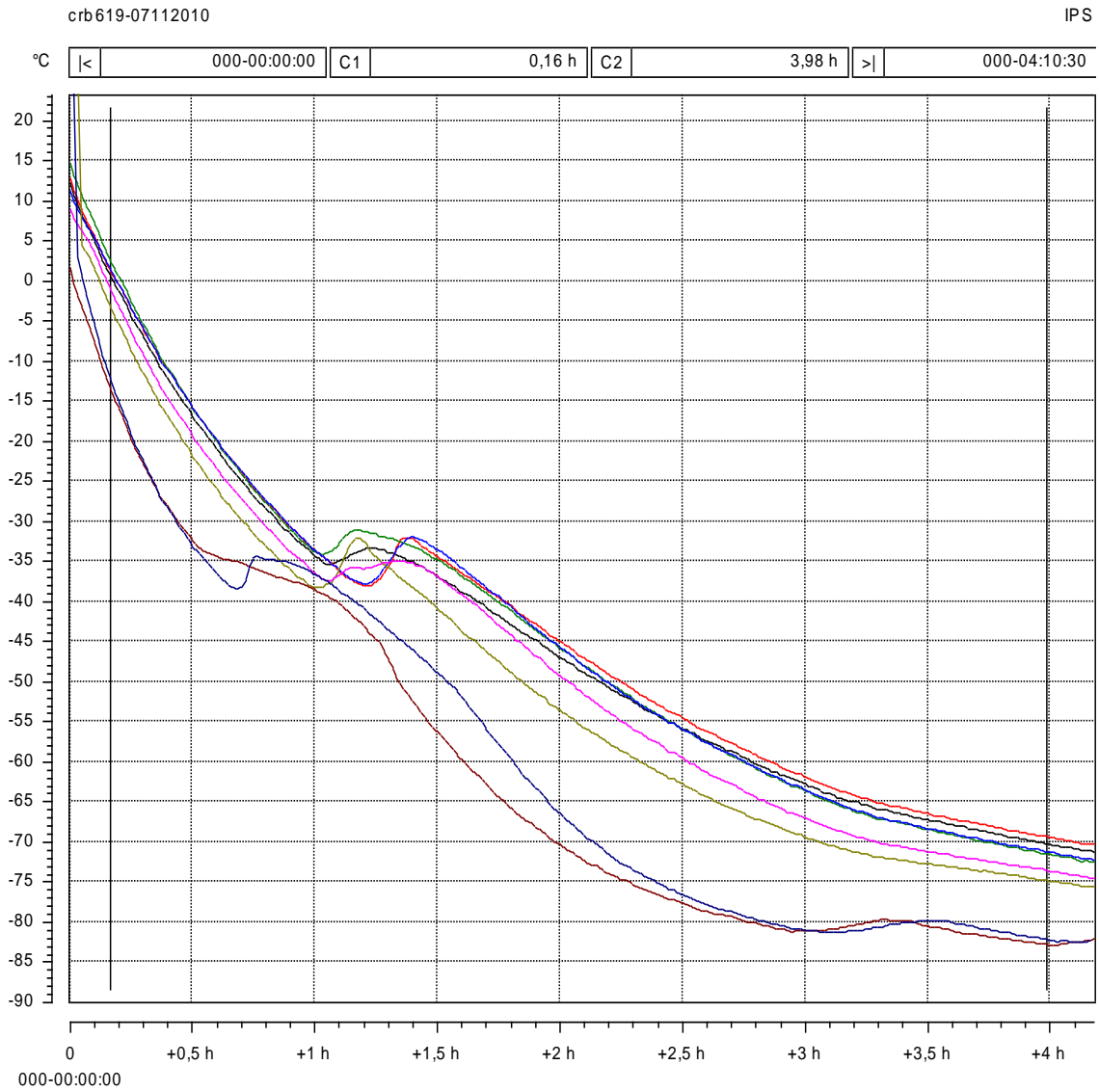
1. Dorset, G. (2001). Historical Review: Descriptions of blood and blood disorders before the advent of laboratory studies. *British Journal of Haematology*, 115, 719-728.
2. Giangrande, P. (2000). The History of Blood Transfusion. *British Journal of Haematology*, 110, 758-776.
3. Ramsey, G. (2008). Frozen red blood cells: cold comfort in a disaster?. *Transfusion*, 48, 2053-2055.
4. Holcomb, J. (2010). Optimal use of blood products in severely injured trauma patients. *Hematology*, 465-469.
5. Bayer, R. (1997). Review: HIV and the blood supply. *American Journal of Public Health*, 87, 3, 474-476.
6. American Association of Blood Banks. (2011). AABB Technical Manual. 17th Edition. Roback JD, editor.
7. National Blood Authority, Commonwealth of Australia (2011). Patient Blood Management Guidelines: Module 1- Critical Bleeding/Massive Transfusion.
8. European Committee on Blood Transfusion; EDQM (2010). Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 16th Edition.
9. McClelland, D.; Pirie E.; Franklin IM. (2010). Manual of Optimal Blood Use. *EU Optimal Use of Blood Project Partners, ISBN 978-0-9564680-0-0. Scottish National Blood Transfusion Service.*
10. Conferência de Consenso: Uso de sangue e derivados (2011). Centro Hospitalar do Porto.
11. Cabrales, P. et al. (2008). Balance between vasoconstriction and enhanced oxygen delivery. *Transfusion*, 48, 2087-2095.

12. British Committee for Standards in Haematology: Blood Transfusion Task Force (2004). Guidelines for the use of fresh-frozen plasma, cryoprecipitate and cryosupernatant. *The British Society for Haematology*, 126, 11–28.
13. Yang et al. (2012). Is fresh-frozen plasma clinically effective? An update of a systematic review of randomized controlled trials. *Transfusion*, 52, 1673-1686.
14. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Centro de Gestão Estratégica (2006). Hemoderivados. Disponível em: <anbio.org.br/pdf/2/tr07_hemoderivados.pdf>.
15. Masarés, RJ.; Rossano, JB. (2005). Hemoderivados. Disponível em: <sefh.es/revistas/vol19/n5/299_301.PDF>.
16. Surgenor, D. (2003). Edwin J. Cohn and the Development of Protein Chemistry. *The New England Journal of Medicine*, 349, 511-512.
17. Farrugia, A.; Cassar, J. (2011). Plasma derived medicines: access and usage issue. *Blood Transfusion*, 10, 2450/2011.0118-11.
18. Nascimento, B. et al. (2011). Cryoprecipitate transfusion: assessing appropriateness and dosing in trauma. *Transfusion Medicine*, 21, 394-401.
19. Alter, H.; Klein, H. (2008). The hazards of blood transfusion in historical perspective. *Blood Magazine*, 112, 2617-2626.
20. Corbin, F. (2002). Pathogen Inactivation of Blood Components- Current Status and Introduction of an Approach Using Riboflavin as a Photosensitiser. *Business Briefing: Medical Device Manufacturing & Technology*.
21. Oyorante, S. (2012). El impacto de los comportamientos de riesgo en la seguridad transfusional. Controversia sobre los hombres que hacen sexo com hombres. *Blood Transfusion*, 10, 3.
22. Council of Europe, Committee of Ministers (2008). Resolution CM on Donor responsibility and on limitation to donation of blood and blood components. Disponível em: <ipsangue.org/ipsangue2011/>.
23. Pérez G. et al. (2012). Estimación de las necesidades transfusionales de hematies y su relación com el envejecimiento poblacional. *Blood Transfusion*, 10, 3.

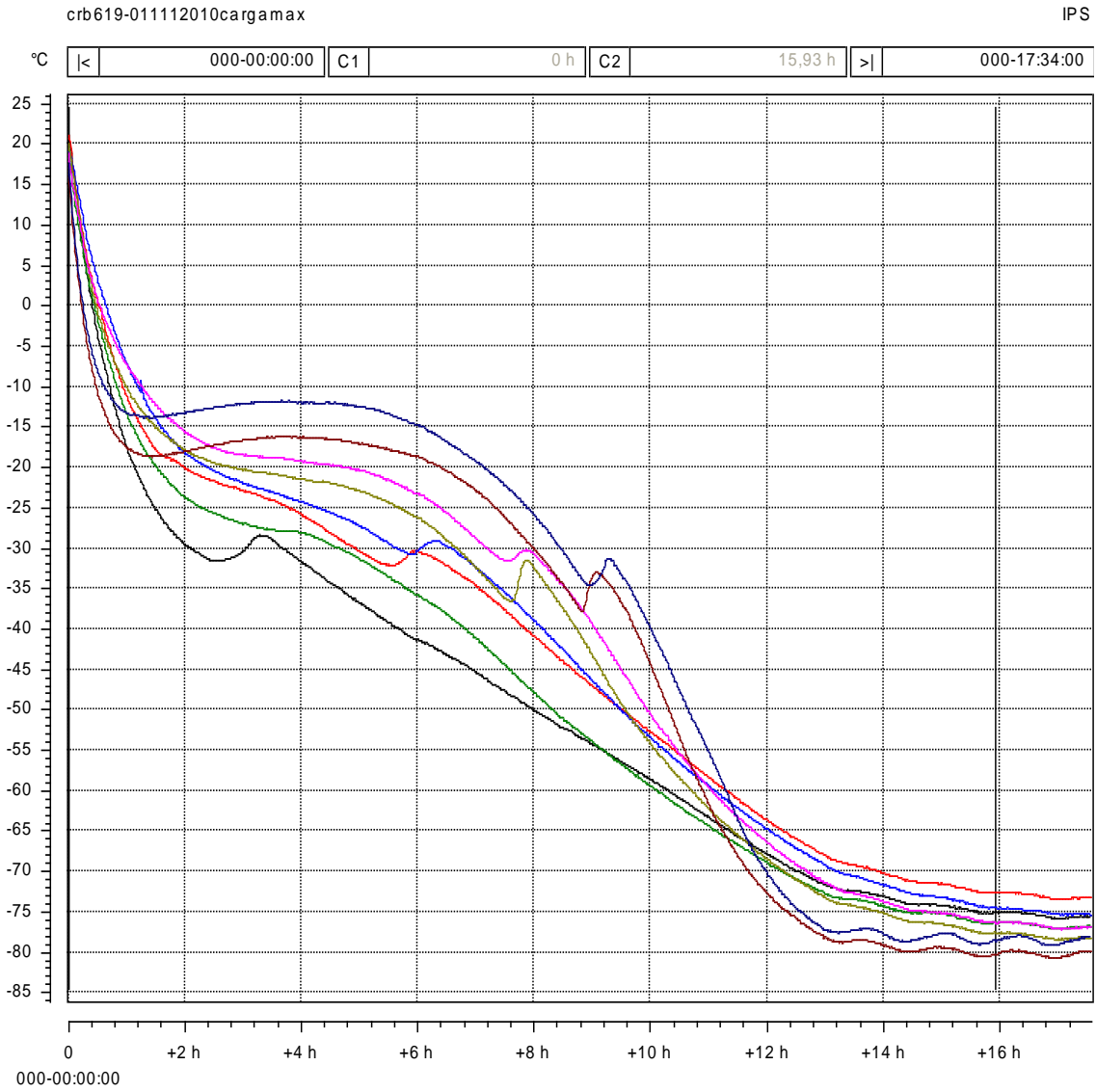
24. González VP. (2012). La transfusión de componentes modificados en situaciones especiales. *Blood Transfusion*, 10, 3.
25. Solheim B.G.; Seghatchian J. (2006). Update on pathogen reduction technology for therapeutic plasma: An overview. *Transfusion and Apheresis Science*, 35, 83-90.
26. McClaskey, J., Xu M., Snyder E. et al. (2009). Clinical trials for pathogen reduction in transfusion medicine: A review. *Transfusion and Apheresis Science*, 41, 217-225.
27. Hornsey V. et al. (2000). Coagulation factor content of cryoprecipitate prepared from methylene blue plus light virus inactivated plasma. *British Journal of Haematology*, 109, 665-670.
28. World Health Organization. (2010) Blood Cold Chain: Guide to the selection and procurement of equipment and accessories.
29. Olim, G. (2010). O Sistema Português do Sangue. *ABO*, 42, 9-14.

V. ANEXOS

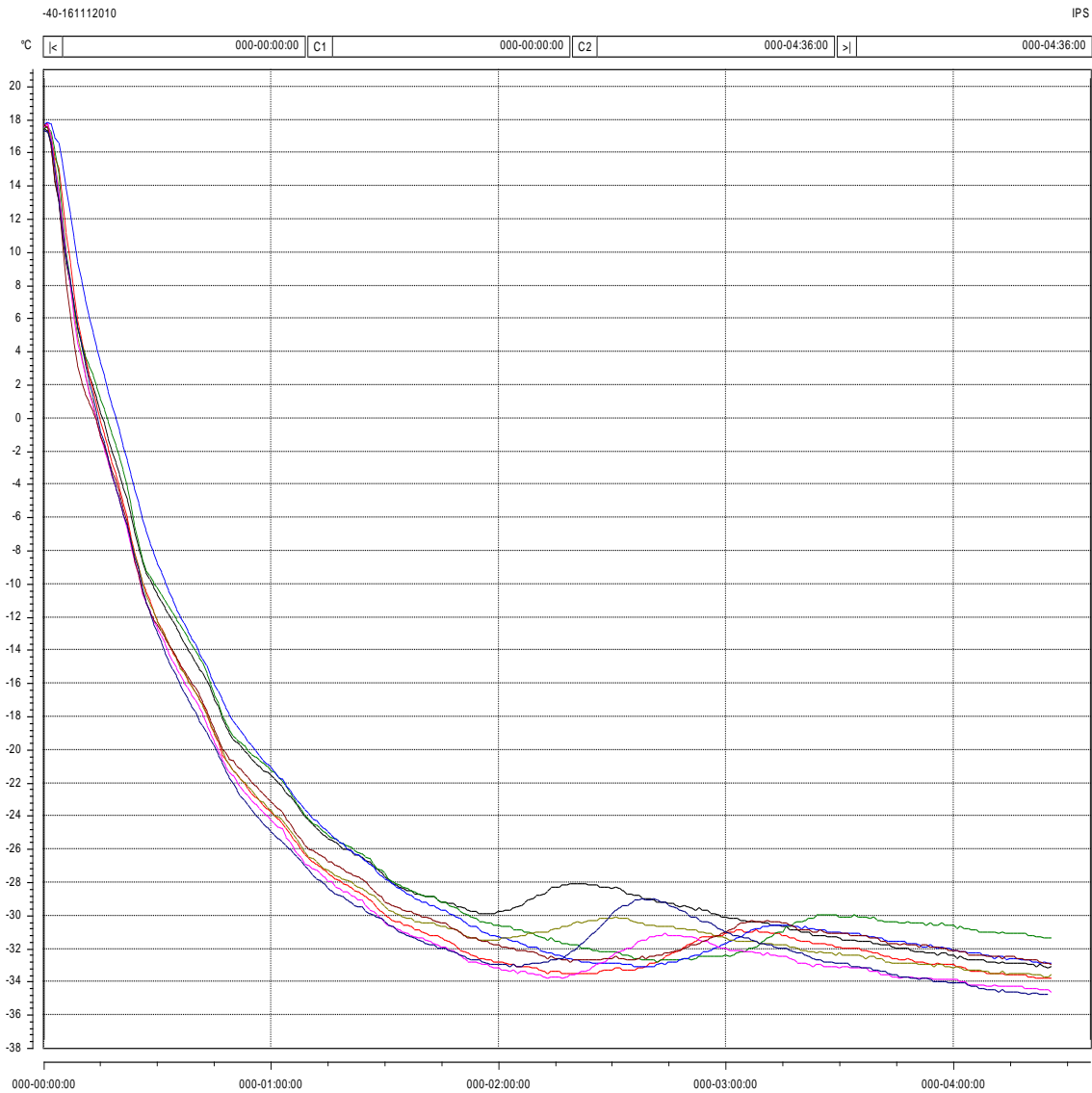
Anexo A – Gráfico da curva de temperatura da Arca 0619.CRB no 1º ensaio



Anexo B – Gráfico da curva de temperatura da Arca 0619.CRB no 2º ensaio



Anexo C – Gráfico da curva de temperatura da Câmara RF0030.PSL no 1º ensaio



Anexo D – Gráfico da curva de temperatura da Câmara RF0030.PSLno 2º ensaio

