



MINISTÉRIO DA SAÚDE

Manual de diagnóstico  
laboratorial das **Coagulopatias**  
**Hereditárias e Plaquetopatias**

Brasília – DF  
2012



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
Secretaria de Atenção à Saúde  
Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados

# Manual de diagnóstico laboratorial das **Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias**

Série A. Normas e Manuais Técnicos

Brasília – DF  
2012



© 2012 Ministério da Saúde.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial. A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica. A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Tiragem: 1ª edição – 2012 – 2.000 exemplares

***Elaboração, distribuição e informações***

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Secretaria de Atenção à Saúde

Departamento de Atenção Especializada

Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados

SAF Sul Trecho 2 Edifício Premium Torre 2 sala 202

70070-600 Brasília/DF

Tel.: (61) 3315-6149

E-mail: [sangue@saude.gov.br](mailto:sangue@saude.gov.br)

Home page: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)

***Coordenação***

Guilherme Genovez

***Elaboração***

Ana Suely Leite Saraiva

Gisele Marília Pianetti Sternick

Maria Emília Santos

Silmara Aparecida Lima Montalvão

Tânia de Fátima G. Siegl Machado

Tânia Rúbia Flores da Rocha

***Revisão Técnica***

Suely Meireles Rezende

João Carlos Campos Guerra

Marinez Matos

***Normalização***

Claudio Oliveira – Editora MS

***Capa, projeto gráfico e diagramação***

Fabiano Bastos

Impresso no Brasil / *Printed in Brazil*

Ficha Catalográfica

---

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada.

Manual de diagnóstico laboratorial das coagulopatias hereditárias e plaquetopatias / Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. – Brasília : Ministério da Saúde, 2012.

132 p. : il. (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

ISBN 978-85-334-1933-9

1. Hematologia. 2. Coagulopatias. 3. Plaquetas. I. Título. II. Série.

CDU 616.151

---

Catálogo na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2012/0116

***Títulos para indexação:***

Em inglês: Guideline of laboratory diagnosis in hereditary coagulopathies and platelets function disorders.

Em espanhol: Manual de diagnóstico de laboratorio de coagulopatías hereditarias y plaquetopatias.

# SUMÁRIO

1	Introdução . . . . .	7
2	Condições mínimas para o funcionamento de um laboratório de hemostasia . . . . .	9
3	Técnica manual e equipamentos disponíveis para os testes de hemostasia . . . . .	11
4	Coleta de amostra para coagulação e suas variações pré-analíticas . . . . .	13
5	Validação dos testes de coagulação e estabilização do intervalo normal de referência . . . . .	15
5.1	O que é validação? . . . . .	15
5.2	Porque validar? . . . . .	15
5.3	Determinação de um intervalo normal de referência . . . . .	15
5.4	Características de desempenho de uma rotina validada . . . . .	16
5.4.1	Verificar a exatidão . . . . .	16
5.4.2	Determinar a precisão. . . . .	17
5.4.3	Determinar a sensibilidade dos fatores da coagulação . . . . .	17
6	Implantação dos controles de qualidade interno e externo no Laboratório de Hemostasia . . . . .	19
6.1	Controle de qualidade interno no Laboratório de Hemostasia . . . . .	20
6.1.1	Controle de qualidade na etapa pré-analítica . . . . .	20
6.1.2	Controle de qualidade na etapa analítica . . . . .	23
6.1.3	Controle de qualidade na etapa pós-analítica. . . . .	26
6.2	Controle de qualidade externo no laboratório de hemostasia. . . . .	26

<b>7</b>	<b>Preparação e calibração de Pool de plasma normal</b>	<b>29</b>
7.1	Coleta e preparação do pool	29
7.1.1	Preparo do pool para teste de inibidor de fator VIII pela técnica de Nijmegen – Bethesda modificada	30
7.1.2	Calibração do pool	31
<b>8</b>	<b>Testes de triagem</b>	<b>33</b>
8.1	Tempo de protrombina	33
8.1.1	Curva de calibração para tempo de protrombina	34
8.1.2	Relação Normalizada Internacional (RNI)	35
8.2	Tempo de tromboplastina parcial ativada	35
8.3	Tempo de Trombina	38
<b>9</b>	<b>Diagnóstico Laboratorial das coagulopatias hereditárias</b>	<b>41</b>
9.1	Doença de von Willebrand	41
9.1.1	Introdução	41
9.1.2	Manifestações Clínicas	42
9.1.3	Diagnóstico	43
9.1.4	Testes laboratoriais	43
9.1.5	Recomendações para coleta e processamento da amostra para os teste de diagnóstico de doença de von Willebrand	74
9.2	Hemofilia	75
9.2.1	Diagnóstico laboratorial da hemofilia	76
9.3	Coagulopatias raras	88
9.3.1	Deficiência de fator VII	89
9.3.2	Deficiência de fator V	91
9.3.3	Deficiência de fator X	93
9.3.4	Deficiência de fator XI	95
9.3.5	Deficiência de fator XII	96
9.3.6	Deficiência de fator XIII	97
9.3.7	Deficiência de fibrinogênio (fator I)	98
9.3.8	Deficiência de fator II (protrombina)	100

<b>10 Plaquetopatias</b> . . . . .	103
10.1 Introdução . . . . .	103
10.2 Testes laboratoriais para a quantificação das plaquetas e caracterização de plaquetopenias hereditárias . . . . .	107
10.3 Plaquetopatias hereditárias . . . . .	109
10.4 Plaquetopatias adquiridas . . . . .	110
10.5 Testes laboratoriais . . . . .	111
10.5.1 Testes de triagem . . . . .	112
10.5.2 Testes específicos . . . . .	114
10.5.3 Testes especiais . . . . .	126
<b>11 Referências</b> . . . . .	129



# 1 INTRODUÇÃO

O Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias tem como objetivo principal abordar os principais aspectos dos testes laboratoriais necessários para o diagnóstico das coagulopatias e plaquetopatias. Desta forma, este manual poderá auxiliar os profissionais que atuam no laboratório a realizar os testes de hemostasia com maior desenvoltura, visando uma padronização das técnicas utilizadas através da descrição de diretrizes básicas para a investigação laboratorial adequada.

Este manual foi elaborado por um grupo de profissionais atuantes em laboratório, que reuniram informações relevantes e atualizadas sobre as técnicas e métodos empregados em laboratório de hemostasia. Serão abordados vários temas relacionados à prática laboratorial, tais como: métodos, reagentes, equipamentos, manuseio de amostras, análise de qualidade e validação. Este manual não deve ser utilizado como fonte de referência única sobre o tema, ficando a cargo dos profissionais atuantes na área a complementação das informações e a atualização contínua com relação à teoria e prática relacionadas ao diagnósticos das doenças citadas.



## 2 CONDIÇÕES MÍNIMAS PARA O FUNCIONAMENTO DE UM LABORATÓRIO DE HEMOSTASIA

Diferentemente de inúmeros procedimentos laboratoriais que passaram a ser realizados exclusivamente em equipamentos semi e/ou totalmente automatizados, os testes usuais de triagem e diagnóstico das coagulopatias continuam dispondo de métodos manuais, que utilizam banho-maria a 37°C para sua realização. O princípio destas técnicas se baseia na detecção visual da formação do coágulo de fibrina.

Nos anos setenta, foram introduzidos os aparelhos semi-automatizados, com princípio de detecção fotométrica ou mecânica da formação da fibrina. Em seqüência, aparelhos totalmente automatizados e interfaceáveis, com sistemas de informação, foram desenvolvidos proporcionando maior agilidade na liberação de resultados em laboratórios clínicos de grande porte.

Diante deste cenário com várias opções, ao planejar a criação de um laboratório de hemostasia, torna-se imperativo quantificar o número de amostras a serem testadas, com vistas a realizar uma avaliação de custo-benefício para a aquisição adequada do equipamento e dos insumos necessários.

O Quadro 1 lista alguns itens indispensáveis para o funcionamento de um Laboratório de Hemostasia.

**Quadro 1** – Insumos básicos necessários ao funcionamento de um Laboratório de Hemostasia

Balança semi-analítica
Banho Maria 37° C, com estante para tubos de hemólise
Centrífuga de bancada com capacidade mínima de rotação de 1700 x g
Climatizador de ambiente (aparelho de ar condicionado ou split) em locais com temperatura superior a 25°C*.
Cronômetro
Freezer - 18°C a - 20°C e - 60°C a - 80°C
Geladeira

*Continua*

### *Continuação*

Reagentes para determinação dos testes de triagem e de diagnóstico de coagulação, de acordo com o método/princípio dos testes

Negatoscópio ou outra fonte de luz para leitura da formação do coágulo

Papel mono-log para gráficos

Pipetas automáticas com volumes em microlitros: 50 µl, 100 µl, 200 µl e 1000 µl

Ponteiras descartáveis compatíveis com as pipetas automáticas

Termômetro

Tubos de hemólise de vidro siliconizado (Pyrex nº 9820)

Tubos para coleta de amostra com Citrato de Sódio 3,2%

\* Temperatura Ambiente ideal: 18 a 25°C.

Fonte: Santilli, João Cláudio, 2006

O projeto arquitetônico da área laboratorial deve observar às normas sanitárias e de segurança do trabalho.

Os laboratórios clínicos, de uma maneira geral, devem atender aos requisitos das seguintes legislações:

- ▶ RDC nº 50, de 21 de fevereiro de 2002, referente às normas arquitetônicas;
- ▶ RDC nº 302, de 13 de abril de 2005, referente ao regulamento técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos.

### 3 TÉCNICA MANUAL E EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS PARA OS TESTES DE HEMOSTASIA

Embora existam muitos aparelhos automatizados disponíveis para a realização de testes em coagulação, a técnica manual ainda é muito utilizada em laboratórios de hemostasia. Esta técnica, além de ser bastante didática para o aprendizado inicial dos métodos em hemostasia, permite, ainda, a comparação dos resultados obtidos com os aparelhos automatizados.

A utilização de tubos de vidro siliconizado permite um melhor desempenho da técnica manual. O tamanho conveniente é de 75 x 10 mm; diferentes tipos de tubo podem ser utilizados, porém estas diferenças podem influenciar no tempo de coagulação obtido, particularmente para testes de triagem como: tempo parcial de tromboplastina ativada (TTPA). Se houver uma mudança na técnica ou nos reagentes utilizados, uma comparação dos resultados deverá ser realizada antes de dar continuidade à rotina de exames. Diferenças sistemáticas entre a técnica manual e automatizada pedem um novo intervalo de normalidade.

Etapas importantes para manter a boa qualidade dos testes realizados manualmente são:

- ▶ os reagentes deverão ser pré-aquecidos a 37°C por pelo menos 5 minutos antes da realização dos testes;
- ▶ o plasma-teste e os reagentes deverão ser misturados rapidamente;
- ▶ o cronômetro deverá ser iniciado simultaneamente com a mistura de reagentes e
- ▶ a leitura deverá ser realizada posicionando o tubo em um ângulo de 90°C por três vezes a cada 5 segundos com constante observação para o início da formação de fibrina.



## 4 COLETA DE AMOSTRA PARA COAGULAÇÃO E SUAS VARIAÇÕES PRÉ-ANALÍTICAS

As variáveis pré-analíticas se referem a todos os fatores que afetam a qualidade da amostra antes do início do teste. A observação das variáveis pré-analíticas nos testes de coagulação é extremamente importante para que se obtenha confiabilidade e qualidade em todos os resultados dos testes de hemostasia.

Para a coleta de amostras de exames de coagulação, o paciente deve estar em jejum mínimo de 4 horas.

Recomenda-se que as amostras sejam coletadas através da utilização de seringa e/ou sistema a vácuo que permita uma coleta rápida, sempre em tubos de vidro siliconizados ou tubos de poliestireno.

As amostras não resultantes de punção imediata devem ser descartadas, pois o material colhido para realização de testes de coagulação deve advir de coleta não traumática e o garroteamento não deve ultrapassar 1 minuto.

Para a determinação da dosagem dos fatores VII, VIII e fator de von Willebrand (FvW), as amostras deverão permanecer em temperatura ambiente, para evitar ativação da coagulação por baixa temperatura.

Na coleta com seringa, a agulha deverá ser sempre retirada ao se transferir o sangue para o tubo contendo o anticoagulante, para que não haja hemólise da amostra, o que inviabiliza os resultados. A homogeneização deve ser feita através da inversão do tubo (5 vezes), delicadamente, sendo esta medida importante para impedir a hemólise. Coletas com seringa e sistemas a vácuo não poderão ser utilizados conjuntamente.

O tubo para coleta deverá conter citrato de sódio (0,109 mol/L) 3,2% tamponado. A solução de citrato de sódio é tamponada para prevenir aumento no pH, o que pode afetar os resultados. Esta solução poderá ser estocada a 4°C por três meses, desde que seja sempre inspecionada para a verificação de material particulado que pode significar contaminação.

A proporção sangue/anticoagulante deve ser exatamente de 9:1 (por exemplo, 4,5ml de sangue para 0,5 ml de citrato).

A concentração de citrato de sódio deverá ser ajustada em pacientes com valores de hematócrito acima de 55%. Em amostras com hematócrito elevado, a relação sangue/anticoagulante (9:1) não é mantida, podendo causar excesso de citrato para o volume de sangue presente no tubo. Isso pode levar a uma falsa elevação do tempo de coagulação. Deve-se, por isto, ajustar o volume de citrato através da fórmula:

$$C = (1,85 \times 10^{-3}) (100 - \text{HCT}) (V \text{ sangue})$$

Onde, C = Volume de citrato;

HCT = Hematócrito do paciente;

V = Volume de sangue adicionado (se o tubo for de 5 mL, então o volume será 4,5 mL).

Para hematócritos abaixo de 30%, não há informações disponíveis que sustente a recomendação específica.

Coleta de amostras de acessos venosos periféricos, profundos ou implantados (AVPPI) ou dispositivos: O sangue deve ser idealmente coletado diretamente de uma veia periférica, mas em algumas ocasiões, principalmente em crianças e pacientes idosos, pode ser necessário coletar amostras de AVPPI. Nos casos de acessos venosos totalmente implantados e salinizados, 2 volumes *do espaço intra-luminal do dispositivo utilizado* devem ser desprezados, antes da coleta de amostras para testes de hemostasia. Quando se utilizar outra forma de acesso venoso, primeiramente lava-se o acesso infundindo com soro fisiológico a 0,9% e após coletam-se 6 volumes de *espaço intra-luminal*, que são descartados antes da coleta das amostras.

# 5 VALIDAÇÃO DOS TESTES DE COAGULAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DO INTERVALO NORMAL DE REFERÊNCIA

## 5.1 O que é validação?

A validação é um processo documentado que demonstra que um procedimento encontra-se estável e é capaz de produzir informações pré-determinadas.

## 5.2 Porque validar?

A principal responsabilidade do profissional que atua no laboratório é assegurar que as informações e serviços providos pelo mesmo atendam as necessidades dos usuários. Para isso, ele deve atentar para informações de cunho científico geradas por instituições de reconhecida excelência pela comunidade científica. Estas instituições regulam e padronizam procedimentos no laboratório, atualizando-os constantemente de acordo com novos conhecimentos. Assim, para que o laboratório mantenha um bom nível de excelência, análises periódicas devem ser realizadas através de consultas na literatura atualizada.

Desta forma, é fundamental que cada laboratório planeje um programa de validação que contemple as necessidades locais. Para orientar a implantação deste programa, algumas diretrizes precisam ser seguidas, tais como as expostas nos próximos tópicos.

## 5.3 Determinação de um intervalo normal de referência

A fim de adequar a interpretação dos resultados dos testes de hemostasia, é fundamental que se tenha informação sobre a população normal (local). A seleção de indivíduos saudáveis para determinação de valores normais será influenciada por considerações práticas da rotina laboratorial local. Mais

frequentemente, doadores de sangue ou funcionários da instituição podem ser utilizados. A seguir, encontram-se algumas considerações importantes para a determinação de um intervalo normal de referência.

Um valor de referência normal deverá ser sempre estabelecido localmente; literatura e informações de bula deverão ser usadas somente como um guia.

Para realização do tempo de protrombina (TP) e do tempo parcial de tromboplastina ativada (TTPA) é possível que um novo lote de reagente da mesma empresa tenha uma faixa de normalidade diferente do anterior. O controle de qualidade interno deverá informar se houve alguma mudança, sendo que algumas delas poderão indicar a necessidade de um novo valor de normalidade.

O número ideal de indivíduos normais ideal para se estabelecer um valor de normalidade é de 120. Porém, pela dificuldade de se obter este número de indivíduos, os estatísticos recomendam uma população de, no mínimo, 40 indivíduos.

Convencionalmente, o valor de referência normal deverá conter 95% dos valores obtidos resultando em uma curva Gaussiana de distribuição normal. Se esta distribuição for diferente, amostras adicionais deverão ser incluídas. Se a distribuição for normal, deve-se, então, calcular a média e o desvio padrão dos valores normais e usar como faixa de normalidade o resultado de 2 desvios padrão para o limite inferior e superior.

## **5.4 Características de desempenho de uma rotina validada**

### **5.4.1 Verificar a exatidão**

Exatidão é a concordância entre a melhor estimativa de uma quantidade e seu valor real. Assim, a inexactidão é expressa por uma diferença numérica entre a média de um conjunto de medições em replicata e o valor verdadeiro, estando, assim, associada ao erro sistemático. A exatidão é um dado importante para correlacionar o resultado obtido no laboratório com a clínica e obter uma investigação diagnóstica adequada. Uma das formas de se avaliar a exatidão é através da participação do laboratório em um

programa de controle de qualidade externo, assunto que será abordado com mais detalhes no capítulo 6.

#### **5.4.2 Determinar a precisão**

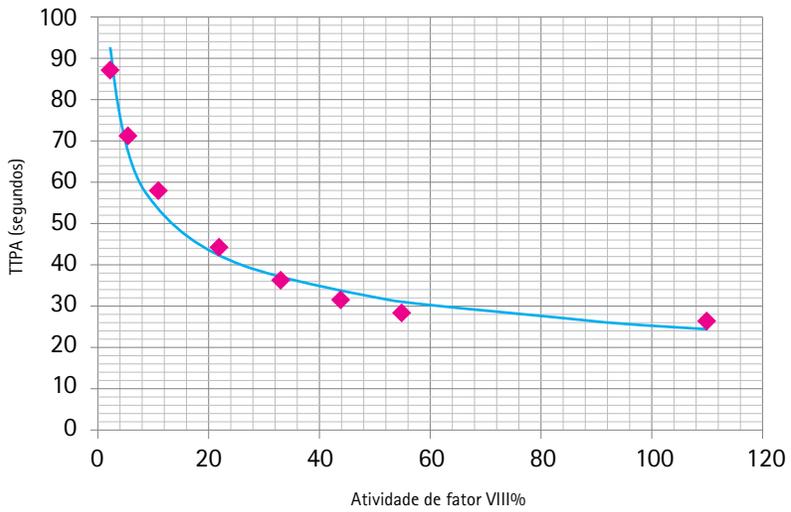
A precisão refere-se à melhor concordância encontrada em medidas repetidas. Esta concordância pode ser verificada através do desvio padrão ou coeficiente de variação, sendo que, quanto menor o desvio padrão, maior a precisão. Esta verificação permite tomada de decisões imediatas na liberação ou não de um resultado.

#### **5.4.3 Determinar a sensibilidade dos fatores da coagulação**

Os testes de TP e TTPA são considerados testes de triagem da coagulação. É importante conhecer a sensibilidade destes testes na identificação da deficiência de diferentes fatores da coagulação. Um teste com pouca sensibilidade, ou seja, incapaz de identificar anormalidades pode gerar resultados inadequados que prejudicam a investigação das coagulopatias. A sensibilidade de um determinado reagente pode ser específica para uso em um determinado equipamento ou para uso combinado com outros reagentes. Recomenda-se, assim, seguir alguns passos para esta verificação:

- ▶ Preparar diluições que avaliam diferentes níveis de concentrações do fator em estudo. Para isso, deve-se utilizar um plasma humano padrão com concentração conhecida como amostra, e um reagente de plasma deficiente no fator em questão, como diluente. Exemplo: fazer diluições com concentrações de 100%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% e 2,5%;
- ▶ Testar cada amostra em duplicata;
- ▶ Fazer uma curva correlacionando o resultado de TTPA ou TP obtido com a concentração esperada;
- ▶ Identificar em qual ponto está o seu intervalo de referência para o TTPA ou TP, que corresponderá à sensibilidade do seu reagente (Gráfico 1).

**Gráfico 1** – Curva para detecção da sensibilidade de reagente



Abreviação: TTPA tempo de tromboplastina parcialmente ativado

Fonte: Montalvão, S. A. L., 2011

## 6 IMPLANTAÇÃO DOS CONTROLES DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO NO LABORATÓRIO DE HEMOSTASIA

O termo garantia da qualidade pode ser usado para descrever todos os procedimentos que são realizados para assegurar a confiabilidade dos testes e análises do laboratório. Isso inclui a escolha do teste, a coleta de uma amostra, a obtenção de um resultado de uma maneira correta, interpretação do resultado, e, quando apropriado, a comunicação destes resultados para o profissional requisitante.

O controle de qualidade interno (CQI) e externo (CQE) são componentes distintos entre si, embora complementares, de um programa de qualidade. O CQI é usado para padronizar uma série de técnicas e processos em realização de acordo com um período de tempo. Assim, ele é usado para garantir a consistência de resultados dia após dia no laboratório. O CQE é utilizado para identificar o grau de acordo entre os resultados de diferentes laboratórios. Desta forma, o CQI propõe avaliar a precisão dos resultados através da sua reprodutibilidade e o CQE avalia a exatidão deste mesmo resultado, uma vez, que resultados precisos não são necessariamente corretos ou exatos. Para isso, torna-se necessário que o laboratório tenha procedimentos definidos para esta avaliação, ou seja, não basta apenas usar controles normais e patológicos, mas estabelecer e padronizar programas consistentes de qualidade (CQI e CQE) que avaliem de maneira constante e rotineira.

Outro item tão importante quanto os já descritos é a padronização dos processos envolvidos desde a solicitação médica dos exames até a liberação do resultado. Todas as atividades do laboratório devem ser documentadas através de instruções de trabalho ou procedimento operacionais padrão (POP), aprovadas e colocadas a disposição do corpo técnico e de apoio. Os POP são documentos que descrevem detalhadamente cada processo do laboratório.

Contudo, é importante ressaltar que a implantação de um programa de qualidade envolve a construção de uma série de processos, cada um com fontes

potenciais de erro. Assim, recomenda-se considerar as seguintes etapas para sua implantação: (1) Etapa pré-analítica, (2) Etapa analítica e (3) Etapa pós-analítica.

O programa dependerá de um fluxo de rotinas próprias de cada laboratório não havendo, assim, um protocolo pronto a seguir, ou seja, cada laboratório deverá propor seu próprio programa de qualidade que contemple os CQI e COE. No entanto, existem algumas recomendações que devem ser utilizados como guia, para que o mesmo seja completo.

## **6.1 Controle de qualidade interno no Laboratório de Hemostasia**

### **6.1.1 Controle de qualidade na etapa pré-analítica**

#### **6.1.1.1 Coleta de amostras**

O procedimento de coleta de amostra foi descrito no capítulo 4. No entanto, estão listados abaixo alguns exemplos de procedimentos para garantir boa qualidade na coleta:

- ▶ quando houver a necessidade de alterar o tubo de coleta quanto ao material ou fabricante, é necessário que sejam conduzidos no laboratório estudos paralelos de validação;
- ▶ a diferença ou variabilidade atribuída aos diferentes tubos ou fabricantes pode não ser aparente para amostras com valores dentro do intervalo de referência, mas pode variar quando valores prolongados são testados.

#### **6.1.1.2 Transporte de amostras**

##### **Transporte de amostra em rotina laboratorial**

O transporte de amostra de sangue total em gelo (2-8°C) não é recomendado para a maioria dos testes de coagulação que utilizam plasma, devido à possibilidade de ativação dos fatores VII, VIII e FvW em baixas temperaturas, além de provocar ativação das plaquetas. Idealmente, o transporte e o processamento das amostras não devem ultrapassar uma hora. É muito

importante que o laboratório tenha documentado, para cada amostra, a data e horário do envio e recebimento da amostra.

### Transporte de amostra de plasma para outra instituição

As amostras deverão ser centrifugadas, o plasma deverá ser separado, acondicionado e enviado em gelo seco. As amostras deverão chegar ao local de destino ainda congeladas.

O procedimento de envio de amostra biológica por via aérea deverá respeitar as normas vigentes no país. Vale lembrar que estas normas sofrem revisões anuais e os procedimentos devem ser observadas antes do envio.

De acordo com o manual IATA (International Air Transport Association) - DGR (Dangerous Goods Regulations), as substâncias (amostras e gelo seco) são consideradas produtos perigosos e seus embarques devem estar de acordo com as regulamentações federais.

O embarcador é o responsável legal e deve assegurar que as substâncias estão apropriadamente identificadas, classificadas, marcadas, etiquetadas, documentadas e em condições para o transporte em conformidade com as regulamentações. Ainda, deve-se comprovar que os produtos perigosos estão embalados em conformidade com todos os requerimentos aplicáveis ao transporte aéreo.

#### Preparo da embalagem

- ▶ Forrar o fundo da caixa de isopor com uma camada de gelo seco de aproximadamente 5 cm;
  - ▶ Posicionar sobre esta camada de gelo seco os containeres (com estantes) fechados contendo os tubos com as amostras congeladas equidistantes entre si e das paredes da caixa do isopor;
- Importante:** As condições de transporte aéreo (vibração, temperatura e pressão) podem provocar um efeito em substâncias e embalagens que alteram o seu estado normal. Desta maneira, não se deve adicionar gelo seco no container (com estante) das amostra e lacrá-lo. Esta substância libera gases que são perigosos quando não houver local para ser extravasado podendo provocar explosões.

- ▶ Cobrir os containers depois de lacrados com gelo seco, formando uma nova camada de gelo seco de aproximadamente 5 cm;
- ▶ Preencher o restante do espaço da caixa com gelo seco de tal forma que não comprometa o fechamento da mesma;
- ▶ Encaixar a tampa da caixa de isopor e selar;
- ▶ Colocar na embalagem as informações do remetente e destinatário
- ▶ **Remetente.** (Nome da instituição / Endereço completo / Nome da pessoa responsável pelo embarque e respectivo telefone)
- ▶ **Destinatário.** (Nome da instituição / Endereço completo / Nome da pessoa responsável pelo recebimento e respectivo telefone)
- ▶ Aplicar uma tira de fita adesiva no centro da caixa de papelão e uma em cada lateral;
- ▶ Identificar a área externa da caixa com a numeração adequada disponível para cada material transportado, de acordo com as especificações da IATA;
- ▶ Entregar a embalagem preparada com os formulários para a empresa de transportes.

### 6.1.1.3 Processamento e estocagem de amostra de plasma

Quanto ao processamento da amostra de plasma, a centrifugação deverá ser realizada a temperatura ambiente. No entanto, algumas centrífugas podem aumentar a temperatura interior no processo de centrifugação. Desta forma, recomenda-se a utilização de centrífugas com monitoramento de temperatura.

Quanto à estocagem de amostras, de acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) algumas considerações de tempo e temperatura devem ser respeitadas (Quadro 2). No entanto, muitos laboratórios utilizam freezers domésticos, que não são adequados para laboratório, devido a sua incapacidade em manter a temperatura a  $-20^{\circ}\text{C}$  após a abertura da porta. Assim, a Federação Mundial de Hemofilia recomenda o não armazenamento de amostras de plasma a  $-20^{\circ}\text{C}$  devendo ser utilizado apenas freezers  $< -35^{\circ}\text{C}$  ou  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## Quadro 2 – Tempo de estocagem de amostras para testes de coagulação

Estocagem de amostras para testes de coagulação							
Teste	Estocagem com sangue total			Alíquota de plasma e processamento			
	TA 25°C	Refrigerado	Congelado	TA 25°C	Refrigerado	Freezer - 20°C	Freezer - 70°C
TP	Até 24 horas	Não	Não	Até 24 horas	Não	2 Semanas	12 meses
TTPA	Até 4 horas	Desconhecido	Não	4 horas	4 horas	2 Semanas	12 meses
TTPA para análise de Heparina não fracionada	1 hora	Desconhecido	Não	4 horas	4 horas	+++ 2 Semanas	+++ Desconhecido
TTPA (para análise de FVIII e FvW)	4 horas	Não	Não	4 horas	4 horas	++++ 2 Semanas	++++ 6 anos
Outros	4 horas	Desconhecido	Não	4 horas	4 horas	Depende da análise ver tabela anexo A-1	

Abreviações: + Sangue total diretamente em gelo ou refrigeração mantida por banho de gelo; ++ Temperatura deve ser controlada; +++ Deve ser pobre em plaqueta; ++++ Deve ser bem homogeneizado antes do teste. Abreviações: TA, temperatura ambiente; TP, tempo de Protrombina; TTPA, tempo de tromboplastina parcialmente ativado; FVIII, fator VIII; FvW, fator de von Willebrand.

Fonte: CSLI, 2008, adaptado

### 6.1.1.4 Descongelamento das amostras de plasma citratado

Amostras de plasma que são descongeladas de forma inadequada podem ter os níveis de fator VIII, FvW e fibrinogênio diminuídos, devido à formação de crioprecipitados. As amostras devem ser descongeladas preferencialmente em banho-maria a 37°C por um período de aproximadamente de 5 minutos e homogeneizadas em seguida, antes dos ensaios.

### 6.1.2 Controle de qualidade na etapa analítica

Consiste na análise diária da amostra controle com valores dos analitos conhecidos para avaliar a precisão dos ensaios. Através do controle de qualidade na etapa analítica (CQI – EA) pode-se avaliar o funcionamento confiável e eficiente dos procedimentos laboratoriais na geração de resultados válidos, que possam contribuir eficazmente no estabelecimento do diagnóstico. Desta forma, o CQI tem a função de garantir a reprodutibilidade (precisão), verificar a calibração do sistema e indicar o momento de se promover ações corretivas quando surgir uma não conformidade.

### 6.1.2.1 Material para controle de qualidade Interno

Com o objetivo de avaliar a precisão de um método é necessário realizar análise de alíquotas de uma mesma amostra. É importante incluir amostras de controle de qualidade com valores normal e anormal para assegurar que um método é controlado em diferentes níveis de resultados. O material de controle deve ser similar à amostra teste e deve ser analisado no mesmo tempo, utilizando a mesma metodologia. O material deve ser estável para uso por um determinado período. Especificamente para testes de coagulação, o material de controle deve ser estocado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  ou estar na forma liofilizada para não comprometer sua estabilidade e, por conseguinte, os resultados. O descongelamento deve ser realizado a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por, no máximo, cinco minutos. Pelo menos um controle de qualidade deve ser incluído em cada grupo de ensaio. Para testes de triagem (TP, TTPA e TT) deve-se incluir um controle normal e um controle anormal a cada início de rotina ou a cada 8 horas para os laboratórios que funcionam 24 horas. Em todos os casos, o material controle deve ser tratado exatamente como a amostra. São quatro os tipos de materiais indicados como controle em um laboratório de coagulação:

- ▶ Controle normal (origem comercial);
- ▶ Controle anormal (origem comercial);
- ▶ Pool de plasma normal (geralmente preparado no laboratório, isto é, *in house*) e
- ▶ Plasma de paciente pré-diagnosticado com uma coagulopatia.

Os controles de origem comercial são úteis devido à estabilidade que apresentam por um determinado período, o que não é atingido com o pool *in house*. Através da utilização destes controles, é possível avaliar isoladamente o sistema equipamento/ reagente independentemente da variação da amostra.

Por outro lado, o pool de plasma é o controle normal mais próximo da amostra do paciente e, por isso, é essencial a sua inclusão no painel de controle do laboratório. O material de um paciente com diagnóstico comprovado de uma coagulopatia é de valia, uma vez que é uma fonte de informação diferente do controle anormal comercial. Por exemplo, no caso de um paciente com o diagnóstico de hemofilia grave cujo nível de fator é menor que 1%, esta amostra auxilia a verificação da curva de calibração em níveis não contemplados por controle comercial. É importante salientar que

a utilização do controle normal e anormal comercial é previsto como uma exigência da Anvisa na RDC nº 302 que normatiza procedimentos de laboratório clínico.

### **6.1.2.2 Limites de aceitabilidade e variação**

Os resultados dos controles são plotados em um gráfico controle e comparado com os limites aceitáveis de erro para aquele analito. Quando os valores encontrados na amostra controle estão dentro dos limites aceitáveis, isto é, dentro da média mais ou menos dois desvios-padrão, conclui-se que o método analítico está funcionando adequadamente. Por outro lado, quando os valores encontrados na amostra controle estão fora dos limites aceitáveis, isto é, o valor encontrado ultrapassa a média mais ou menos dois desvios-padrão, a equipe deve ser alertada para a possibilidade de problemas no processo, indicando que o método analítico não está funcionando adequadamente.

Atualmente, existem vários sistemas de controle para as variáveis analíticas. De uma maneira geral, o emprego destes sistemas é muito útil para sanar inúmeros problemas que surgem na realização de um exame de laboratório.

Um bom sistema de controle deve ter as seguintes características:

- ▶ Prever a avaliação do desempenho de métodos, equipamentos e técnicas. Os sistemas de controle de qualidade internos mais empregados são:
  - Sistema de controle de Levey-Jennings
  - Sistema de controle através pelas regras Westgard
- ▶ Fornecer informações sobre exatidão e precisão de cada método;
- ▶ Ter sensibilidade suficiente para detectar variações nas diversas fases do ensaio;
- ▶ Ser fácil de implantar, manter e interpretar e
- ▶ Ser capaz de revelar os diversos tipos de erros ou variações que possam ocorrer.

As amostras para CQI comerciais são providas com bulas que fornecem um intervalo de resultado aceitável. No entanto, os resultados obtidos são dependentes de reagentes e da maneira de detecção do método. O intervalo de referência deverá demonstrar essas variações e, desta forma, ser

determinado por cada laboratório, sendo a bula do controle utilizado apenas como um guia. De acordo com a Federação mundial de Hemofilia (FMH) o CV% (coeficiente de variação em %) dos resultados em diferentes dias para TP e TTPA deve ser menor que 8% e, preferencialmente, mais baixo. Para os outros ensaios, tal como dosagem de fatores da coagulação, o CV% pode chegar a 10%.

### **6.1.3 Controle de qualidade na etapa pós-analítica**

Os processos pós-analíticos consistem nas etapas executadas após a realização do exame. Estes são: cálculo de resultado, análise da consistência de resultados, liberação dos laudos, armazenamento de material, transmissão e arquivamento de resultados. Um exemplo deste tipo de análise é a avaliação de paralelismo de curvas (padrão, controle e paciente) na realização da dosagem de fatores de coagulação, explanado no capítulo 9.

## **6.2 Controle de qualidade externo no laboratório de hemostasia**

O CQE é considerado um controle interlaboratorial. Consiste na comparação da exatidão dos exames de um laboratório com os de outros. O CQE visa padronizar os resultados de laboratórios diferentes através da comparação interlaboratorial de análises de alíquotas do mesmo material. Em um programa de CQE abrangente, análises respectivas dos resultados obtidos por laboratórios participantes permitem, não somente a identificação do laboratório com resultado discordante, mas também a análise de todos os reagentes e métodos inadequados que o laboratório possa possuir em sua rotina. Com a participação efetiva neste programa o laboratório pode assegurar que os seus resultados se aproximam o máximo possível do valor real (exatidão) dentro de uma variedade analítica permitida. No CQE, os laboratórios participantes analisam amostras-controle de concentrações desconhecidas que lhes são enviadas pelo programa. Após a análise, o programa recebe os resultados dos participantes, separa-os por grupo de metodologias e reagentes iguais (quando possível), determina a média de consenso de cada grupo e calcula o respectivo desvio-padrão. Por último,

é realizada uma avaliação dos resultados de cada laboratório e emitido ao participante um conceito, de aceitabilidade ou não.

A principal função do CQE é testar a competência individual do laboratório. A participação contínua no programa está relacionada com um melhor desempenho individual, assim como a uma menor variabilidade dos resultados. Há muitas razões possíveis para um laboratório produzir um resultado insatisfatório, podendo o(s) fator(es) responsável(is) ser imediatamente identificado(s). Por outro lado, a identificação de problemas latentes nem sempre é óbvia. Grandes programas são capazes de identificar alterações no desempenho dos testes, os quais são relativamente específicos para problemas em reagentes ou metodologia utilizados. A total confidencialidade dos resultados deve ser uma importante característica do programa.



## 7 PREPARAÇÃO E CALIBRAÇÃO DE POOL DE PLASMA NORMAL

### 7.1 Coleta e preparação do pool

O pool local poderá ser preparado coletando-se sangue de 20 a 40 pessoas sadias e que não tenham usado nenhuma medicação que possa interferir com os fatores da coagulação nos últimos 10 dias. É importante salientar que o número de doadores para composição do pool deve representar a distribuição normal obtida, por isso recomenda-se que quanto maior o número de doadores, melhor qualidade tem o pool.

Para que se obtenha uma distribuição homogênea, o ideal é que se tenha um número semelhante de homens e mulheres com idade entre 20 e 50 anos.

#### Materiais

- ▶ Tubos plásticos com anticoagulante citrato de sódio a 3,2%;
- ▶ Frascos Erlenmeyer ou becker plástico;
- ▶ Tromboplastina cálcica;
- ▶ Cefalina;
- ▶ Cloreto de cálcio 0,025 M.
- ▶ Tubos de hemólise (12 x 75 mm)
- ▶ Micropipetas automáticas;
- ▶ Banho-maria a 37° C;
- ▶ Microtubos plásticos com tampa;
- ▶ Caixa para armazenamento em Freezer;
- ▶ Banho de gelo.

Recomenda-se que todo o procedimento, desde a coleta até o congelamento, não exceda quatro horas. Após a centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos para obtenção de plasma pobre em plaqueta (PPP), deve-se proceder ao processamento, sem demora, do TP e TTP de todas as amostras para verificar se os resultados se encontram dentro da faixa de normalidade estabelecida pelo laboratório. As amostras, cujos resultados estiverem fora desta faixa deverão ser descartadas, não devendo ser utilizadas para a preparação do

pool. Deve-se observar, ainda, a presença de hemólise ou lipemia, devendo ser excluídos os plasmas lipêmicos e/ou hemolisados. Durante a preparação, manter as amostras de plasma em gelo. A seguir, deve-se pipetar a mesma quantidade de plasma de cada amostra coletada, misturá-los em recipiente de plástico grande, homogeneizar bem, evitando a formação de bolhas e, em seguida, testar a mistura para os testes de TP e TTPA.

O valor obtido do pool de plasma normal deve ser anotado e utilizado como parâmetro de CQI em ensaios posteriores.

Para uso na rotina laboratorial, alíquotas mínimas de 0,5 ml a 1,0 ml devem ser preparadas e acondicionadas em microtubos plásticos tipo *ependorf* com tampa. Estes tubos devem ser identificados com data de realização e o nome do técnico que preparou o pool. Deve-se proceder ao congelamento rápido das alíquotas, seguidas de armazenamento em estantes identificadas com a sigla "PPN". Uma vez descongelada para uso, a alíquota de pool não poderá ser utilizada novamente.

A validade do pool varia de acordo com as condições de armazenamento; por seis meses e três meses, se armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  e  $-35^{\circ}\text{C}$ , respectivamente.

### **7.1.1 Preparo do pool para teste de inibidor de fator VIII pela técnica de Nijmegen – Bethesda modificada**

O método de Bethesda com a modificação de Nijmegen é a técnica de escolha para a realização do teste de quantificação de inibidor. Para realização desta técnica, recomenda-se o preparo de um PPN específico que tenha uma estabilidade melhor, uma vez que, esta técnica exige condição de temperatura diferenciada. Deve-se utilizar tubos para coleta contendo o anticoagulante citrato de sódio 0,109 M (3,2%) previamente tamponado com imidazol sólido na seguinte proporção: a cada 25 ml da solução de citrato de sódio 0,109 M adicionar 1,7g de imidazol sólido. Essa modificação aumenta a sensibilidade e especificidade do teste. Para evitar resultados falso-positivos é importante assegurar que o pool tenha cerca de 100% de fator VIII.

#### **Materiais**

- ▶ Tubos para coletacom anticoagulante citrato de sódio a 3,2%;
- ▶ Imidazol sólido, C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>

- ▶ Rolhas de borracha siliconadas;
- ▶ Tubo de hemólise;
- ▶ Pipetas automáticas

Outra forma de preparar este pool é através da adição de tampão imidazol sólido na concentração de 0,1 M ao pool já preparado, ajustando o pH por adição lenta de 1N HCl, em agitação constante a 4°C.

Obs: De acordo com a técnica original o ajuste de pH do plasma tamponado para 7,4 é feito com HCl 1N, mas na prática diária a adição de HCl nessa concentração promove uma diluição significativa do plasma e conseqüentemente do fator VIII:C. Uma alternativa para evitar a diluição do plasma é a adição lenta de HCl mais concentrado, 5N em agitação constante a 4°C.

### 7.1.2 Calibração do pool

A obtenção do pool de doadores de sangue baseia-se na necessidade de se ter um plasma referência representativo da população local para uso como calibrador na rotina do laboratório de hemostasia. Poderá ser utilizado como controle normal e para realização das curvas de calibração de TP, fibrinogênio e dosagem de fatores. Uma mistura preparada seguindo a técnica descrita acima, de forma correta, tem concentração de aproximadamente 100 U/dl (100%) ou 1 U/ml para os fatores II, V, VII, IX, X, XI e XII. Já para os fatores VIII e FvW, a concentração obtida é variável, não podendo, assim, assumir concentração de 100 U/dl. Desta forma, não é recomendada sua utilização para calibração do fator VIII e FvW.

Objetivando padronizar mundialmente as substâncias utilizadas para diagnóstico das coagulopatias, a Organização Mundial de Saúde possui preparações-padrão, (OMS International Biological Reference – National Institute for Biological and Control - NIBISC) com concentrações conhecidas e unidades padronizadas. Existem fornecedores que utilizam estas preparações como referência para preparo de calibradores e controles comerciais. Portanto, quando não há disponibilidade de calibrador comercial para realizar uma curva de referência recomenda-se a calibração do pool com preparações de referência (NIBISC).



## 8 TESTES DE TRIAGEM

### 8.1 Tempo de protrombina

O TP avalia as via extrínseca e comum da coagulação. É dependente da integridade dos fatores VII, V, II, e X. O teste consiste na adição de tromboplastina ao plasma (fator tecidual) e posterior mensuração do tempo de coágulo. O fator tecidual ativa o fator VII, ativando a via extrínseca, formando o complexo protrombinase ancorado pela tromboplastina, que culmina na geração de trombina. Esta atua na molécula do fibrinogênio, formando a fibrina, que será estabilizada pelo fator XIII.

Um TP prolongado pode indicar deficiências hereditárias, principalmente do fator VII ou adquiridas, como deficiência de vitamina K, doença hepática, coagulação intravascular disseminada ou uso de medicamentos. É o teste de escolha para monitorizar o uso de anticoagulantes orais antivitamina K.

O TP é mais sensível à deficiência do fator VII e tem menor sensibilidade aos fatores da via comum e na deficiência de fibrinogênio.

A tromboplastina ou fator tecidual pode ser extraído de tecido cerebral humano, de porco ou coelho. Atualmente, fator tecidual recombinante vem sendo cada vez mais utilizado, e o TP mensurado com essa tromboplastina parece ser mais confiável na identificação de variantes de deficiência de fator VII.

A origem da tromboplastina interfere na sua sensibilidade, por isso os resultados de um TP do mesmo paciente na mesma amostra podem variar de um laboratório para outro. Em função disso, criou-se uma tromboplastina padrão. Conforme será explicado adiante, os reagentes para TP devem ser comparados à tromboplastina padrão, e essa comparação é chamada de Índice de Sensibilidade Internacional (ISI).

#### Materiais e Reagentes

- ▶ Tubos de ensaio de vidro 12 x 75 mm
- ▶ Tromboplastina cálcica

- ▶ Micropipetas automáticas (100 a 200 µl)
- ▶ Cronômetro
- ▶ Banho-maria 37°C
- ▶ Solução salina

#### Procedimento

Incubar a 37° C por 60 segundos 100 µl de plasma citratado pobre em plaquetas (PPP);

Adicionar 200 µl de tromboplastina cálcica pré-aquecida a 37°C

Cronometrar o tempo de coagulação. As provas deverão ser realizadas em duplicata.

### 8.1.1 Curva de calibração para tempo de protrombina

A cada mudança de lote ou marca do reagente é necessário realizar a curva de calibração, para que se calcule a atividade enzimática a partir da diluição seriada de um plasma calibrador conhecido. Deve-se fazer diluições do calibrador em tampão utilizando tubos plásticos e testar para obtenção do tempo em segundos, conforme Tabela 1:

**Tabela 1** – Modelo para construção de curva de calibração do tempo de protrombina

Atividade enzimática (%)	Diluição do calibrador
100	Puro
50	1:2
25	1:4
12,5	1:8
6,25	1:16

Fonte: Autoria própria

Os tempos de coagulação de cada diluição são relacionados graficamente com as respectivas atividades percentuais, em escala mono-log. Para validar a curva, deve-se testar um plasma controle normal e anormal (controles internos) conhecidos.

### 8.1.2 Relação Normalizada Internacional (RNI)

A RNI foi instituída pela Organização Mundial de Saúde para padronizar as diferenças de resultados de TP entre os vários laboratórios. Essas diferenças ocorrem devido à diferença de métodos, aparelhos e tromboplastinas. Todos os fabricantes de tromboplastina devem determinar o ISI mediante a padronização de sua tromboplastina frente a uma tromboplastina de referência internacional (International Reference Preparation) proveniente de cérebro humano, que define a sensibilidade do reagente. Quanto mais próximo de 1,0 for o ISI (International Sensibility Index) mais sensível é a tromboplastina.

O cálculo do RNI é feito de acordo com a seguinte fórmula:

RNI:  $(\text{TP do paciente} / \text{TP normal})^{\text{ISI}}$

Os resultados do TP podem ser reportados em tempo de protrombina, atividade enzimática (%) e RNI. O valor de referência para o TP varia de acordo com o reagente utilizado.

Um tempo de protrombina alargado está relacionado com uso de medicamentos, hepatopatias ou deficiência de fator VII, principalmente. Como já mencionado, o TP é pouco sensível à deficiência de fibrinogênio. Entretanto, na hipofibrinogenemia grave (abaixo de 100 mg/dl de fibrinogênio) e na afibrinogenemia (ausência de fibrinogênio), o TP encontra-se alargado e incoagulável, respectivamente. O teste da mistura (com pool de plasma normal na proporção 1:2) deve ser realizado para identificar se o prolongamento ocorre por deficiência de fator ou presença de inibidor. Se houver correção do TP, deve-se determinar o fator VII inicialmente. Caso sua dosagem esteja normal, deve-se avaliar o resultado do TTPA e então testar, os fatores V, II ou X de acordo com a clínica do paciente. Não havendo correção do TP na mistura, deve-se fazer a pesquisa de inibidores dirigidos contra fatores da via extrínseca e comum. Os inibidores de fator VII são raros.

## 8.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada

O TTPA é o teste de triagem para a avaliação dos fatores das vias intrínseca e comum da coagulação. Detecta as deficiências dos fatores VIII, IX, XI e XII, precalicreína e cininogênio de alto peso molecular. Dependendo da

sensibilidade do reagente, o TTPA pode ser mais sensível às deficiências de fator VIII e IX, e menos sensível às deficiências dos fatores XI e XII ou dos fatores envolvidos na via comum. É usado como teste de triagem para deficiências de fator, presença de inibidores e para monitorar o uso da heparina não fracionada.

Quando uma mistura de plasma e fosfolípideo (substituto da plaqueta) é recalcificada, a fibrina é formada a uma velocidade normal que depende dos fatores envolvidos na via intrínseca (pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular, fatores VIII, IX, XI e XII) e na via comum (fatores X e V, protrombina e fibrinogênio). O TTPA é realizado por adição de tromboplastina parcial, a cefalina, que é uma substância carregada negativamente e um ativador da via intrínseca. O cloreto de cálcio é adicionado e o tempo necessário para formar o coágulo é medido.

A tromboplastina parcial utilizada no TTPA é incapaz de ativar a via extrínseca, que requer tromboplastina completa, isto é, o fator tecidual. Por consequência, este teste faz um bypass na via extrínseca, não sendo afetado pela deficiência de fator VII.

No caso de controle de heparinoterapia não fracionada, é importante realizar o teste o mais rápido possível (em até 1 hora) após a coleta, para evitar a neutralização heparina pelo fator plaquetário 4.

#### Materiais e Reagentes

- ▶ Tubos de vidro 12 x 75 mm
- ▶ Micropipeta automática (100 µl)
- ▶ Cefalina contendo um ativador (sílica, caolim, ácido elágico, etc)
- ▶ Cloreto de cálcio 0,025 M
- ▶ Cronômetro
- ▶ Banho-maria a 37°C
- ▶ Procedimento
- ▶ 100 µl do plasma teste 100 µl de cefalina ativada
- ▶ Incubar a mistura a 37°C por 3 minutos
- ▶ 100 µl de cloreto de cálcio 0,025 M pré-aquecida a 37° C

## Cronometrar o tempo de coagulação

As provas deverão ser realizadas em duplicata

Resultados: Os resultados são relatados em tempo (em segundos) e relação TTPA paciente/TTPA média do valor de referência.

Um TTPA prolongado com um TP normal indica uma possível deficiência dos fatores VIII, IX, XI, XII, cininogênio de alto peso molecular, precali-creína ou a presença de um inibidor da via intrínseca. Nesses casos, uma mistura de plasma normal e plasma teste deverá ser feita (1 parte de plasma teste + 1 parte de plasma normal, v/v).

Caso haja correção de mais de 50% da diferença existente entre os tempos de coagulação do plasma-teste e da misturas sugere-se a deficiência de um fator. Caso contrário, a ausência de correção sugere a presença de um inibidor de um dos fatores da coagulação, ou do tipo não específico, tal como um anticoagulante lúpico. O cálculo para a interpretação dos resultados está descrito no capítulo 9.

O TTPA deve ter sensibilidade para detectar deficiências de fator. Entretanto, a sensibilidade é reagente-dependente e certos reagentes podem não detectar deficiências moderadas de fator.

Portanto, a escolha do reagente para TTPA deve ser feita cuidadosamente, uma vez que existem no mercado diversos tipos de cefalinas, com diferentes sensibilidades a heparina, às deficiências de fator e a presença de anticorpo lúpico. Além disso, a fosfatidilserina e fosfatidilinositol são importantes na composição da cefalina. Ainda, tem sido descrito uma melhor sensibilidade do ativador sílica para detecção da deficiência de fatores da coagulação em relação ao ácido eláxico.

Adicionalmente, quando se avalia novos lotes de reagentes de coagulação, é importante determinar seu nível de sensibilidade para detectar deficiências de proteínas da coagulação, tal como descrito no capítulo 5.

### 8.3 Tempo de Trombina

O TT avalia o tempo de coagulação do plasma citratado na presença de trombina, permitindo testar a conversão de fibrinogênio a fibrina.

A trombina é adicionada ao plasma-teste para determinar o tempo de formação do coágulo. O tempo de coagulação, após a adição de trombina do plasma, é inversamente proporcional a concentração de fibrinogênio plasmática.

O TT avalia diretamente o fibrinogênio funcional, sendo utilizado para investigar defeitos na molécula do fibrinogênio. Está prolongado na presença de heparina, em altas concentrações de imunoglobulinas (por exemplo, na macroglobulinemia de Waldenstrom), nas disfibrinogenemias, na hipofibrinogenemia, estando incoagulável na afibrinogenemia.

O TT para uso clínico deve ter concentração de trombina de aproximadamente 4 U/ml para que se obtenha um tempo normal de cerca de 20 segundos. Assim, o teste terá sensibilidade suficiente para detectar anormalidades leves do fibrinogênio.

#### Material e reagentes

- ▶ Tubos de vidro 12 x 75 mm
- ▶ Solução fisiológica
- ▶ Trombina 4 U/ml (humana ou bovina)
- ▶ Micropipetas automáticas (100 µl e 200 µl)
- ▶ Cronômetro
- ▶ Banho-maria a 37° C

#### Técnica

- ▶ 200 µl do plasma teste
- ▶ Incubar a 37° C por 60 segundos
- ▶ Adicionar 100 µl da trombina
- ▶ Cronometrar o tempo de coagulação
- ▶ As provas deverão ser realizadas em duplicata

*Obs.: A solução mãe de trombina pode ser mantida congelada, mas a solução de trabalho deve ser descartada após uso.*

O TT é um teste de alta sensibilidade à presença de heparina, sendo utilizado para detecção de heparina não fracionada contaminante de amostras colhidas de cateter de longa permanência, mantidos com heparina. Neste caso, o TT é incoagulável e o TTPA prolongado, devendo ser feita nova coleta, de preferência com coleta em sítio distante do vaso cateterizado.

#### Avaliação clínica dos testes de triagem

O conhecimento sobre o princípio do teste, sua aplicação e resultado auxilia sugerir o diagnóstico. Por exemplo, se um paciente tem apenas TTPA prolongado, tem história de sangramento e é do sexo masculino, o diagnóstico diferencial em ordem decrescente deve incluir deficiência dos fatores VIII, IX e XI. Os fatores da via intrínseca que prolongam o TTPA, mas não estão relacionados com história de sangramentos são o fator XII, precalicreína, e cininogênio de alto peso molecular. As deficiências dos fatores da via extrínseca e comum, quando muito graves, se associam a prolongamento também do TTPA, como por exemplo, na afibrinogenemia (Quadro 3).

#### Quadro 3 – Interpretação de testes de triagem

TTPA anormal isoladamente
Associado com sangramento: deficiência dos fatores VIII, IX e XI.
Não associado com sangramento: deficiência de fator XII, pré-calicreína, cininogênio de alto peso molecular e anticorpo lúpico.
TP anormal isoladamente
Deficiência de fator VII
TP e TTPA anormais
Anticoagulantes, coagulação intravascular disseminada, deficiência de vitamina K, transfusão maciça
Afibrinogenemias, deficiências de fatores X, V e II.

Fonte: Santos, Maria Emilia, 2010



# 9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS COAGULOPATIAS HEREDITÁRIAS

## 9.1 Doença de von Willebrand

### 9.1.1 Introdução

O FvW é uma proteína de adesão, sintetizado pelas células endoteliais e megacariócitos. Está presente no plasma, subendotélio e nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas em forma de oligômeros contendo um número variável de subunidades.

A primeira das três funções conhecidas do FvW na hemostasia é de se ligar às estruturas expostas do sub-endotélio e, subseqüentemente, às plaquetas, através do complexo de receptores plaquetários GPIb-IX-V. Essa interação inicia a hemostasia primária, principalmente em condições de alto fluxo vascular (alta força de cisalhamento). A segunda função é a ligação entre as plaquetas (agregação plaquetária) através dos receptores GPIIb-IIIa plaquetários, também em condições de alta força de cisalhamento. Além disso, o FvW participa da hemostasia secundária, transportando o fator VIII na circulação, que quando livre é rapidamente inativado.

A doença de von Willebrand (DvW) é a doença hemorrágica hereditária mais freqüente e apresenta diferentes expressões fenotípicas com sinais e sintomas de intensidade variável.

Em 1993, Sadler, baseado em estudos de mutação genética, classificou a doença em dois grandes grupos: doença resultante de alteração quantitativa e qualitativa.

Alteração quantitativa tipo 1: é a mais freqüente, sendo caracterizada pela deficiência parcial do FvW. Esses pacientes podem apresentar sangramento de intensidade leve a moderada. Este fenótipo heterogêneo se deve a existência de 3 subtipos: tipo 1 "plaqueta normal", que se apresenta com quantidade e função normais de FvW intraplaquetário; tipo 1 "plaqueta

baixa", que se apresenta com redução da quantidade do FvW, mas com função normal e o tipo 1 "plaqueta discordante", que se apresenta com quantidade normal de FvW e função diminuída.

Alteração quantitativa tipo 3: é caracterizada por níveis plasmáticos e plaquetários indetectáveis do FvW, o que ocasiona manifestações hemorrágicas graves.

Alteração qualitativa tipo 2: esta se subdivide em subtipo 2A que apresenta redução da função dependente de plaquetas, associada à ausência dos multímeros intermediários e de alto peso molecular; subtipo 2B que se apresenta com maior afinidade pela GPIb plaquetária e ausência dos multímeros de alto peso molecular; subtipo 2M que se apresenta com redução da função dependente de plaquetas não devido a ausência de multímero de alto peso molecular e subtipo 2N (ou Normandy) que se apresenta com menor afinidade do FvW pelo fator VIII.

Algumas disfunções plaquetárias assemelham-se à DvW, como por exemplo, a DvW do tipo plaquetário ou pseudo DvW. Trata-se de uma alteração da glicoproteína Ib (GPIb) plaquetária com grande afinidade pelo FvW.

### 9.1.2 Manifestações Clínicas

As formas mais leves da DvW são, na maioria das vezes assintomáticas, podendo se apresentar com sangramento muco-cutâneo tais como equimose, epistaxe, gengivorragia e menorragia. Por outro lado, as formas mais graves (DvW tipo 3) cursam com quantidade de fator VIII bastante reduzida, e, conseqüentemente, podem apresentar sangramentos internos, dentre os quais hemartroses e hematomas intramusculares, manifestações estas semelhantes à hemofilia grave.

A DvW pode ser adquirida, podendo, neste caso, estar associada a outras doenças, tais como mieloma múltiplo, linfoma não Hodgkin, doenças mieloproliferativas, gamopatias monoclonais, lúpus eritematoso sistêmico, outras doenças autoimunes ou idiopática. A DvW adquirida é rara.

### 9.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico de DvW é geralmente realizado em 3 etapas: (i) identificação do paciente com possível DvW, baseado na história clínica e em testes laboratoriais; (ii) diagnóstico e definição do tipo de DvW e (iii) caracterização do subtipo da doença (Figura 1).

### 9.1.4 Testes laboratoriais

Os testes laboratoriais necessários para o diagnóstico da DvW são divididos em:

#### Testes de triagem

- ▶ Tempo de sangramento (TS)
- ▶ Contagem de plaquetas
- ▶ TTPA

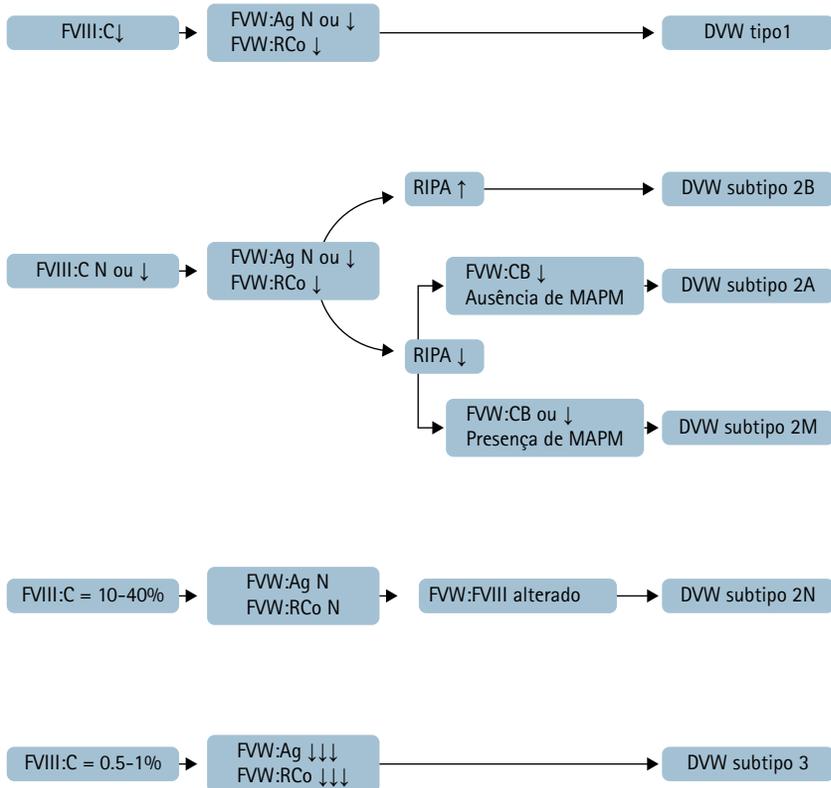
#### Testes confirmatórios

- ▶ Determinação do fator VIII:C
- ▶ Determinação plasmática do FvW antígeno (FvW:Ag)
- ▶ Determinação da atividade do FvW (FvW:RCo)
- ▶ Ligação do FvW ao Colágeno (FvW:CB)

#### Testes especiais

- ▶ Agregação plaquetária induzida pela ristocetina (RIPA)
- ▶ Capacidade de ligação ao FVIII (FvW:FVIII B)
- ▶ Análise multimérica do FvW

**Figura 1** – Fluxograma para interpretação dos testes para diagnóstico da doença de von Willebrand



Abreviações: FvW:Ag, fator de von Willebrand antígeno; FvW:RCof, cofator de ristocetina; FVIII:C, fator VIII coagulante; FvW:RCof/FvW:Ag, relação da atividade do fator de ristocetina e fator de von Willebrand antígeno; FvW:VIII, teste de ligação do fator VIII:C ao fator de von Willebrand; FvW:CB, ligação do fator de von Willebrand ao colágeno; RIPA, agregação plaquetária com ristocetina; MAPM, multímero de alto peso molecular; N, normal; ↓, diminuído; ↓↓↓, muito diminuído; ↑, aumentado.

Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento da doença de Von Willebrand, 2006, adaptado

#### 9.1.4.1 Testes de triagem

A investigação laboratorial da DvW tem início com os seguintes testes de triagem: TS, contagem de plaquetas e o tempo de tromboplastina parcial ativado.

Muitos centros europeus e americanos abandonaram o TS, substituindo-o pelo teste de análise da função plaquetária através do emprego do analisador de função plaquetária, que é um equipamento, que simula, *in vitro*, a alta força de cisalhamento do vaso. Este apresenta maior sensibilidade, principalmente para o diagnóstico da DvW.

No Brasil, a disponibilidade deste equipamento é recente e devido ao seu alto custo, poucos centros o utilizam.

### Tempo de sangramento

O TS é um teste laboratorial realizado *in vivo* que avalia a função hemostática das plaquetas, vasos e FvW. O TS se refere ao tempo de duração do sangramento de uma pequena incisão provocada com o auxílio de uma lanceta.

Há duas técnicas comumente utilizadas, a primeira foi desenvolvida por Duke, sendo posteriormente modificada por Ivy e colaboradores através da introdução do esfigmomanômetro para manutenção da pressão arterial a 40 mm de Hg durante o teste. Mais tarde, uma empresa farmacêutica desenvolveu um dispositivo com tamanho e profundidade de incisão padronizados (Ivy modificado).

Infelizmente, a maioria dos laboratórios no Brasil utiliza o TS pelo método de Duke, devido ao alto custo do dispositivo mencionado.

Tempo de sangramento de Ivy modificado

O teste é realizado na região anterior do antebraço

#### Material

- ▶ Algodão em álcool 70%
- ▶ Esfigmomanômetro
- ▶ Papel de filtro

Dispositivo estéril e descartável para a incisão (que permite incisão de 1 mm de profundidade para adulto e 0.5 mm de profundidade para crianças abaixo de 9 anos de idade)

## Cronômetro

### Procedimento

Com o auxílio do esfigmomanômetro é aplicada uma pressão constante de 30 mm Hg em crianças e 40 mm Hg em adultos. Após assepsia da região anterior do antebraço, é feita uma incisão padronizada quatro dedos abaixo da prega do cotovelo através de um dispositivo descartável, sendo, então, o cronômetro imediatamente acionado. A cada 30 segundos o sangue liberado deve ser absorvido com o papel de filtro sem que este entre em contato com a incisão. O teste deverá ser controlado no máximo até 15 minutos. Caso o sangramento não pare, o teste deve ser interrompido, o local comprimido com uma gaze seca e o resultado reportado como superior a 15 minutos. O valor normal depende do dispositivo utilizado.

### Interpretação

O TS prolongado reflete as alterações quantitativas e/ou qualitativas das plaquetas, vasos e do FvW. Apesar da técnica de Ivy modificada ser mais sensível quando comparada à de Duke, aquela não é reprodutível, sendo pouco sensível para o diagnóstico de disfunções leves a moderadas. No caso da DvW, o teste não deve ser utilizado para diagnóstico, podendo apresentar resultados normais ou prolongados, uma vez que é dependente do FvW intraplaquetário.

Quanto ao teste realizado em analisadores de função plaquetária, os resultados são anormais na maioria dos pacientes com DvW, exceto no subtipo 2N. Porém, pacientes com o tipo 1 leve e moderado e tipo 2 podem apresentar resultados normais.

## Contagem de plaquetas

A contagem de plaquetas por método manual ou automatizado auxilia no diagnóstico de plaquetopenia que pode ocorrer na DvW do subtipo 2B.

### Contagem de plaquetas por método manual

#### Coleta

O sangue para a contagem de plaquetas deve ser colhido preferencialmente em EDTA. Em casos de suspeita de pseudo-plaquetopenia, o sangue deve

ser colhido também em citrato de sódio 3.2% e ao resultado devem ser acrescidos 10% ao número de plaquetas obtido.

Solução de lise dos eritrócitos e diluição das plaquetas:

- ▶ Oxalato de amônio 1%
- ▶ Oxalato de amônio ----- 10 g
- ▶ Água destilada q.s.p. ----- 1000 ml

Após a solubilização completa, a solução deve ser filtrada para a retirada de qualquer resíduo que possa interferir na contagem. A solução pode ser mantida em geladeira por até 2 meses. Essa solução facilita a contagem de plaquetas em câmara de Neubauer por deixar a membrana da plaqueta brilhante, diferenciando-a de outras partículas.

Procedimento

- ▶ Aspirar 100 µl de sangue com pipeta automática, enxugando a ponteira, sem absorver o sangue do interior da ponteira.
- ▶ Dispensar o volume no tubo plástico contendo 1,9 ml de oxalato de amônio 1%.
- ▶ Tampar o tubo e homogeneizar o sangue diluído 5 vezes e aguardar 10 minutos para a hemólise completa.
- ▶ Preparar a câmara de Neubauer. A laminula deve ficar totalmente fixada na câmara.
- ▶ Após 10 minutos da lise, preencher a câmara com o material, sem permitir a formação de bolhas ou extravasamento do líquido para fora da laminula
- ▶ Deixar a câmara preenchida em repouso por 10 minutos...em câmara úmida (recipiente fechado com bolas de gaze umedecidas.)
- ▶ Fazer contagem das plaquetas presentes em 5 dos 25 quadrantes centrais (mesmo local de contagem de hemácias e plaquetas). Se número de plaquetas for abaixo de 10.000/mm<sup>3</sup>, as plaquetas presentes nos 25 campos devem ser contadas.
- ▶ Valor normal: 150.000 – 450.000/mm<sup>3</sup>

### Interpretação

Geralmente, o número de plaquetas na DvW é normal, com exceção do subtipo 2B que pode apresentar plaquetopenia leve.

### Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA)

O TTPA é o teste de triagem dos fatores da via intrínseca da coagulação. É utilizado como teste de triagem na DvW por ser sensível a diminuição do fator VIII. Nos tipos e subtipos da doença que cursam com níveis reduzidos do FvW é detectado o prolongamento do teste. A técnica de execução do TTPA foi descrita no capítulo 8, seção 8.2.

### Interpretação

Na DvW, o TTPA pode estar normal ou prolongado, o que depende dos níveis plasmáticos de fator VIII:C. Nas formas mais graves do tipo 1, tipo 3 e subtipo 2N ocorre o prolongamento do teste.

### 9.1.4.2 Testes confirmatórios

#### Determinação da atividade do fator VIII

Usualmente a determinação do fator VIII:C é realizada pelo método coagulométrico de um estágio baseado na geração de trombina induzida por adição de cefalina ativada (TTPA). Este método é descrito no capítulo 9 seção 9.2.1.2.

### Interpretação

Na DvW tipo 3, os níveis plasmáticos do fator VIII:C são de 1% a 5% devido a grande redução ou ausência da sua proteína transportadora. Já na DvW tipo 1, os níveis de fator VIII:C são ligeiramente mais elevados em relação ao FvW:Ag, podendo ser normais.

No tipo 2 (exceto o tipo 2N com fator VIII:C diminuído), os níveis de fator VIII:C são duas a três vezes maior que a atividade do FvW.

#### Determinação do fator de von Willebrand

A determinação da concentração plasmática do FvW:Ag é essencial para o diagnóstico da DvW. A determinação deve ser acurada, caso contrário, a distinção entre defeitos quantitativos e qualitativos torna-se praticamente impossível.

Atualmente, diferentes métodos imunológicos estão disponíveis, porém com diferentes sensibilidade e especificidade.

O método de eletroimunodifusão foi o primeiro a ser desenvolvido. Brevemente, seu método envolve a adição de gel de agarose a 1% contendo anticorpo anti-FvW a uma placa de vidro. Posteriormente, um pequeno volume de plasma calibrador em várias diluições e de plasmas testes é adicionado nos orifícios feitos no gel de agarose. A placa é submetida a uma corrente elétrica e com a migração do FvW ocorre a precipitação antígeno-anticorpo. Formam-se picos, que são visualizados através de corantes específicos de proteínas, cuja altura é diretamente proporcional à concentração do antígeno na amostra.

Apesar de ser um método simples, ele foi substituído por outros métodos mais sensíveis e melhor padronizados, tal como o método de Elisa.

Recentemente, foram desenvolvidos métodos automatizados com base em aglutinação com partículas de látex (LIA). Segundo Budde, o LIA apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis ao método Elisa. Além de rápida determinação, possibilita, ainda, a avaliação de uma única amostra em situação de urgência.

De acordo com estudos realizados em laboratórios europeus, americanos e asiáticos, comparando-se os diferentes métodos de quantificação do FvW:Ag, o método de eletroimunodifusão apresenta grande variação dos resultados e pouca sensibilidade a baixos níveis do FvW quando comparado ao método Elisa. Esses fatores também foram encontrados no método que utiliza partículas de látex, além da interferência do fator reumatóide. O método Elisa foi considerado o mais sensível e com baixa variabilidade entre os ensaios, tanto os desenvolvidos *in house* quanto os comerciais. Porém, a confiabilidade dos resultados é dependente da procedência dos reagentes utilizados e, principalmente, da curva de calibração. O Comitê Internacional de Hemofilia e Doença de von Willebrand recomenda a utilização do plasma referência da Organização Mundial de Saúde por apresentar níveis acurados não somente do FvW, mas também de fator VIII:C, cofator de ristocetina e ligação FvW-colágeno.

## Método Elisa

### Princípio

Consiste da reação do anticorpo capturante (anticorpo específico anti-FvW) e um segundo anticorpo ligado à enzima peroxidase (anticorpo secundário). Quando o complexo equimolar anticorpo capturante – antígeno – anticorpo secundário é formado na presença de um substrato específico, ocorre o desenvolvimento de cor que é diretamente proporcional à concentração do antígeno.

### Materiais e reagentes

- ▶ microplacas de 96 orifícios
- ▶ micropipeta automática de 12 canais (100 µl)
- ▶ micropipeta automática de 100 µl
- ▶ lavadora de microplaca de Elisa
- ▶ leitora de microplaca de Elisa com filtro 492 nm
- ▶ anticorpo de coelho policlonal anti-von Willebrand humano
- ▶ anticorpo de coelho anti- von Willebrand humano conjugado com peroxidase
- ▶ albumina de soro bovino (BSA)
- ▶ Orto-diamino fenileno (1,2-benzenodiamino) - OPD - tabletes de 5 mg
- ▶ Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30%
- ▶ Cloreto de sódio (NaCl)
- ▶ Trisma base
- ▶ Bicarbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)
- ▶ Carbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>)
- ▶ Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · 2H<sub>2</sub>O
- ▶ Fosfato de sódio dihidratado (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O)
- ▶ Tween 20
- ▶ Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)
- ▶ Ácido clorídrico (HCl concentrado)
- ▶ Ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

#### Quadro 4 – Preparo de soluções para o teste FvW:Ag

##### Preparo das soluções para FvW:Ag

##### **Tampão de sensibilização da microplaca de Elisa (pH 9.6) Solução A**

Bicarbonato de sódio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.43 g

Carbonato de sódio  $\text{NaHCO}_3$  0.72 g

Água  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 250 ml

##### **Tampão de lavagem Solução B**

Tris 4.85 g

Cloreto de sódio  $\text{NaCl}$  11.68 g

Solubilizar os sais em 1 litro de água  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Adicionar ácido clorídrico  $\text{HCl}$  concentrado até pH 7.4

Tween 20 2 ml

Água  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 2 litros

##### **Tampão de revestimento Solução C**

Tris 1.21 g

Cloreto de sódio  $\text{NaCl}$  2.92 g

Soro de albumina bovina BSA 25 g

Adicionar ácido clorídrico  $\text{HCl}$  concentrado até pH 7.4

Água  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 500 ml

##### **Tampão de diluição (amostras e plasma padrão) (10 vezes concentrado)**

##### **Solução D**

Trisma base 4.84 g

Cloreto de sódio  $\text{NaCl}$  11.68 g

Soro de albumina bovina BSA 20 g

Adicionar ácido clorídrico  $\text{HCl}$  concentrado até pH 7.4

Tween 20 2 ml

Água  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 200 ml

##### **Tampão do anticorpo secundário (10 vezes concentrado) Solução E**

Tris 1.21 g

Cloreto de sódio  $\text{NaCl}$  2.92 g

Albumina bovina BSA 0.5 g

Adicionar ácido clorídrico  $\text{HCl}$  concentrado até pH 7.4

Água  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 50 ml

##### **Tampão do substrato (10 vezes concentrado) Solução F**

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.25 g

Fosfato de sódio  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  3.90 g

Adicionar  $\text{H}_3\text{PO}_4$  até pH 5.9

##### **Solução de bloqueio da reação Solução G**

Ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M

Fonte: Federici AB, 1996

Procedimentos:

- ▶ Sensibilização da microplaca - em cada orifício da microplaca adiciona-se 125 µl do anticorpo primário diluído em solução A (5 a 10 µg/ml). A seguir, veda-se a placa para evitar a evaporação.
- ▶ Incubar a microplaca por 12 horas a 40°C (pode-se deixar a microplaca por até 10 dias em geladeira)
- ▶ Lavar a microplaca 2 vezes com a solução B (volume de 200 µl)
- ▶ Adicionar 170 µl da solução C em todos os orifícios e em seguida mantê-la sob agitação constante (a 200 rpm) por 2 horas
- ▶ Lavar a microplaca 4 vezes com a solução B (volume de 200 µl)
- ▶ Diluir o plasma referência com a solução D
  - 1:50 (100%) (10 µl plasma + 490 µl solução D) – diluição 1
  - 1:100 (50%) (100 µl diluição 1 + 100 µl solução D) – diluição 2
  - 1:200 (25%) (100 µl diluição 2 + 100 µl solução D) – diluição 3
  - 1:400 (12,5%) (100 µl diluição 3 + 100 µl solução D) – diluição 4
  - 1:800 (6,25%) (100 µl diluição 4 + 100 µl solução D) – diluição 5
  - 1:1.600 (3,12%) (100 µl diluição 5 + 100 µl solução D) – diluição 6
  - 1:3.200 (1,56%) (100 µl diluição 6 + 100 µl solução D) – diluição 7
- ▶ As amostras teste devem ser diluídas na mesma solução D com base na atividade do fator VIII:C. Por exemplo, os pacientes que apresentarem atividade do fator VIII:C entre 60-150%, a diluição deve ser 1:200; nos com menos de 60%, as diluições serão 1:50 e 1:100 e com a atividade maior que 150%, as amostras devem ser diluídas 1:400.

*Obs. Tanto a curva referência quanto as amostras teste devem ser realizadas em duplicata.*
- ▶ Incubar 100 µl de cada diluição da curva referência e das amostras teste por 2 horas à temperatura ambiente.
- ▶ Lavar a microplaca 3 vezes com a solução B (volume de 200 µl)
- ▶ Adicionar 100 µl de anticorpo secundário diluído em solução E na concentração de 5 µg/ml
- ▶ Agitar a microplaca à temperatura ambiente por 60 minutos
- ▶ Lavar a microplaca 3 vezes com a solução B
- ▶ Preparar o substrato por adição de 5 mg de OPD em 12 ml de tampão F e 10 µl de peróxido de hidrogênio 30%

- ▶ Adicionar 100 µl da solução em cada orifício e manter a microplaca à temperatura ambiente, no abrigo da luz, por 10 minutos
- ▶ A reação é bloqueada por adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M
- ▶ A leitura espectrofotométrica é realizada a 492 nm
- ▶ A curva de referência deve ser traçada em papel semi-logarítmico (densidade óptica versus % de FvW)

Os resultados das amostras teste deverão ser obtidos a partir da curva referência.

Se a amostra teste foi diluída 1:100 e 1:200, o resultado obtido a partir da curva deve ser multiplicado por 2 e 4, respectivamente

#### Interpretação

Na DvW tipo 1 o nível plasmático do FvW:Ag pode estar leve ou moderadamente reduzido; no tipo 3 é indetectável ou muito baixo (< 1%). Esses níveis de FvW:Ag são descritos por Manucci. Já nos subtipos 2A, 2B e 2M os níveis são levemente reduzidos. No subtipo 2N, o FvW:Ag pode estar normal.

#### Determinação da atividade do fator de von Willebrand–diferentes métodos

O primeiro método de avaliação da atividade do FvW foi o cofator de ristocetina (FvW:RCo) desenvolvido por Macfarlane em 1975. O teste se baseia na aglutinação de plaquetas lavadas e formolizadas na presença de ristocetina e FvW, com a utilização de agregômetro. Mais tarde, Evans e colaboradores descrevem a mesma metodologia, porém com detecção visual da aglutinação das plaquetas, possibilitando a execução do teste em laboratórios que não dispõem de equipamento. Embora os métodos apresentem um alto coeficiente de variação ainda assim, são considerados padrão ouro para avaliação da atividade do FvW.

Devido aos altos índices de erros no diagnóstico da DvW por problemas técnicos apresentados no teste de cofator de ristocetina, foram desenvolvidos outros métodos de avaliação funcional do FvW. Inicialmente foram os testes funcionais imunológicos por técnica de Elisa com fragmentos da glicoproteína Ib (GPIb) da plaqueta capturados na microplaca, na presença de ristocetina. Outra técnica de Elisa é a utilização de anticorpo monoclonal anti-domínio A1 do FvW ligados à microplaca.

Com o avanço tecnológico dos coagulômetros, testes automatizados de leitura turbidimétrica de partículas de látex sensibilizadas com anticorpo monoclonal contra o domínio A1 do FvW (LIA) tem tido bastante destaque na rotina laboratorial.

Apesar da rapidez, do baixo coeficiente de variação e grande utilização pelos laboratórios, a literatura apresenta poucos estudos comparando a eficiência desses testes em relação ao método padrão ouro.

Um estudo americano recente comparou o limite de detecção, a linearidade e precisão entre os testes FvW:RCo por agregometria e LIA em 492 pacientes com DvW. Os resultados obtidos mostraram que os dois testes apresentam excelente correlação e que o teste LIA tem sensibilidade e especificidade superior ao FvW:RCo em discriminar a doença do tipo 1 grave para 2M, assim como a DvW adquirida.

Mas, segundo Favaloro, os testes imunológicos de atividade que utilizam anticorpo monoclonal refletem melhor a especificidade de ligação do anticorpo ao FvW do que propriamente a atividade do fator. Isto não se aplica ao teste funcional FvW:CB, desenvolvido nos anos 80 também por Elisa, que avalia a ligação do domínio A3 do FvW ao Colágeno. Sua capacidade de ligação depende da presença dos multímeros de alto peso molecular. A discriminação do teste entre FvW normal e com ausência dos altos pesos moleculares do FvW é de cerca de 90%.

Até recentemente, o teste FvW:CB era apenas realizado *in house*, devido a dificuldade de ligação estável do colágeno à placa de Elisa por um longo período. Atualmente, encontram-se no mercado dois kits comerciais com microplacas sensibilizadas com o colágeno tipo III de sensibilidade comparada ao teste *in house*, porém de alto custo.

O teste FvW:CB é utilizado como teste complementar ao FvW:RCo e FvW:Ag não somente para a diferenciação dos subtipos 2A e 2M, mas também dos subtipos 2A e 2B.

Uma outra avaliação funcional do FvW é o teste de ligação FvW e FVIII (FvW:VIII B). É considerado um teste especial e realizado em serviços especializados de diagnóstico da doença de von Willebrand e outras coagulopatias. Trata-se de um teste importante para diferenciar a DvW tipo 2N da

hemofilia A leve ou moderada. A intensidade do defeito de ligação do fator VIII:C ao FvW varia com diferentes tipos de mutações, que até o momento, foram identificadas nos domínios D' e D3 do gene que codifica o FvW.

Os métodos utilizados para a avaliação da afinidade entre o fator VIII:C e o FvW podem ser: cromogênico, imunológico ou ambos.

### **FvW:RCo – Método agregométrico**

#### Princípio

O FvW:RCo por método agregométrico avalia a atividade do FvW na presença de plaquetas humanas normais lavadas e fixadas com formalina. As plaquetas tratadas são adicionadas aos plasmas teste ou de referência, em várias diluições, e a ristocetina em concentração constante. No passado, a ristocetina foi utilizada como antibiótico, tendo sido retirada do mercado por causar plaquetopenia. A ristocetina promove mudanças estruturais no FvW facilitando a sua ligação com a GPIb plaquetária com conseqüente aglutinação.

A reação de aglutinação das plaquetas é detectada através do agregômetro de sistema óptico acoplado a um registrador com velocidade do papel de 5 cm/minuto.

#### Preparo das plaquetas formolizadas

- ▶ Coletar o sangue em ACD ou utilizar 1 a 2 bolsas de concentrado de plaquetas dentro do prazo de validade.
- ▶ Centrifugar o concentrado de plaquetas a 1.500 x g por 1 minuto à temperatura ambiente para retirada de hemácias contaminantes da bolsa.
- ▶ Centrifugar o concentrado durante 15 minutos a 1.500 x g à temperatura ambiente.

*Durante o tempo de centrifugação, preparar os tampões de lavagem I e II.*

- ▶ Descartar o sobrenadante utilizando bomba de vácuo e ressuspender as plaquetas (sem formação de bolhas) no tampão de lavagem do tipo I (30 ml) e manter a 37°C por 10 minutos.

- ▶ Centrifugar as plaquetas incubadas no tampão de lavagem do tipo I por 15 minutos a 1.500 x g a 37°C.
- ▶ Descartar o sobrenadante e ressuspender o botão plaquetário no tampão de lavagem do tipo II (20 ml).

*Obs. Caso o botão plaquetário ainda estiver contaminado com hemácias tentar retirá-las.*

- ▶ Incubar por 10 minutos a 37°C.
- ▶ Enquanto as plaquetas estiverem incubadas, preparar a solução de formaldeído a 2% em tampão Tyrode Plain.
- ▶ Adicionar 20 ml de formaldeído 2% após os 10 minutos de incubação das plaquetas ressuspensas no tampão de lavagem do tipo II.
- ▶ Incubar a mistura por 60 minutos a 37°C (Obs. certificar se o nível de água do banho-maria cobre todo o volume da mistura).
- ▶ Após o tempo de incubação, deixar em geladeira até o dia seguinte.

*O conteúdo é transferido para dois tubos de 20 ml e, se após o dia seguinte houver sedimentação de hemácias, tentar desprezá-las com o auxílio de ponteira plástica.*

- ▶ Completar com Tampão Plain Tyrode até 50 ml.
- ▶ Centrifugar por 15 minutos a 1.500 x g à temperatura ambiente.
- ▶ Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 50 ml de Tampão Plain Tyrode
- ▶ Incubar por 10 minutos a 37°C.

*Enquanto as plaquetas estiverem incubadas, preparar a solução de formaldeído a 2% em tampão Tyrode Plain.*

- ▶ Adicionar 20 ml de formaldeído 2% após os 10 minutos de incubação das plaquetas ressuspensas no tampão de lavagem do tipo II.
- ▶ Incubar a mistura por 60 minutos a 37°C (Obs. certificar se o nível de água do banho-maria cobre todo o volume da mistura).

*Após o tempo de incubação, deixar em geladeira até o dia seguinte.*

*O conteúdo é transferido para dois tubos de 20 ml e, se após o dia seguinte houver sedimentação de hemácias, tentar desprezá-las com o auxílio de ponteira plástica.*

- ▶ Completar com Tampão Plain Tyrode até 50 ml.
- ▶ Centrifugar por 15 minutos a 1.500 x g à temperatura ambiente.
- ▶ Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 50 ml de Tampão Plain Tyrode

Preparo da ristocetina

Solução estoque (50 mg/ml)

Ressuspender frasco de 100 mg de monossulfato de ristomicina (>90% ristocetina A balanceada com ristocetina B) em 2 ml de água destilada.

Curva de referência

O plasma referência deve ser diluído 1:2 (100%), 1:4 (50%), 1:8 (25%), 1:16 (12.5%) e 1:32 (6.25%) com tampão Plain Tyrode

O plasma teste deve ser diluído 1:2 ou 1:4 dependendo dos níveis de FvW:Ag

Teste

300 µl de plaquetas lavadas

100 µl das diferentes diluições do plasma referência ou plasma teste diluído

8 µl de ristocetina 50 mg/ml (concentração final de 1 mg/ml)

**Quadro 5** – Preparo de soluções para o teste FvW:RCo

<b>Preparo das soluções para FvW:RCo</b>
<b>Solução ACD, pH 4.5</b>
Citrato de sódio dihidratado 10 g
Ácido cítrico monohidratado 6 g
Dextrose 8 g
H <sub>2</sub> O q.s.p. 400 ml
<b>Soluções estoques de Tyrode (se mantidas a 4°C, podem ser conservadas por 2 meses)</b>
<b>Estoque I</b>
NaCl 16 g

*Continua*

*Continuação*

KCl 0.4 g

NaHCO<sub>3</sub> 2 g

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g

H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml

**Estoque II**

MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 2.033 g (0.1M)

H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml

**Estoque III**

CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 2.191 g (0.1 M)

H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml

**Tampão Plain Tyrode pH 7.35**

Solução estoque I 5 ml

H<sub>2</sub>O q.s.p. 100 ml

**Solução de albumina bovina (BSA)**

Albumina bovina 17.5 g

Solução fisiológica (NaCl 0.9%) 100 ml

Estocar à - 80°C em alíquotas de 1 ml

**Creatinina Fosfo Quinase (CPK) tipo I de músculo de coelho – frasco de 500 U (liofilizado)**

Fosfocreatina (CP) 500 mM

Preparar em tampão Tyrode Plain, alíquotar vários tubos de 500 µl e manter a -20°C

Mistura de CP + CPK (preparar imediatamente antes do uso)

500 U CPK + 500 µl CP

Heparina 5.000 U (manter alíquotas a -20C)

Formaldeído 37%

**Tampão de lavagem das plaquetas pH 7.35 (solução A)**

Estoque I 2.5 ml

Estoque II 0.5 ml

Estoque III 1.0 ml

Dextrose 0.05 g

BSA 17.5% 1.0 ml

H<sub>2</sub>O q.s.p. 50 ml

HCl 0.5N para o acerto do pH

Tampão de lavagem tipo I

Solução A 30 ml

Heparina 0.3 ml

CP/CPK 0.3 ml

*Continua*

### Continuação

Preparar na hora do uso e manter a 37°C

Tampão de lavagem tipo II

Solução A 20 ml

CP/CPK 0.2 ml

Preparar na hora do uso e manter a 37°C

Fonte: Federici AB, 1996

### Calibração do aparelho

- ▶ 0% de transmitância: 300 µl de plaquetas lavadas + 100 µl de plasma diluído
- ▶ 100% de transmitância: 250 µl de plaquetas lavadas + 250 µl de PT (branco)

*Cada vez que se adiciona a ristocetina, o aparelho deve ser recalibrado.*

- ▶ Velocidade de reação é de 5 cm/minuto
- ▶ A curva de referência deve ser traçada em papel semi-logarítmico

### FvW:RCo método visual

O método descrito é uma associação do ensaio macroscópico de aglutinação e a técnica de fixação de plaquetas descrita por Evans e Austen

### Princípio

Plaquetas normais são fixadas com solução de formaldeído e misturadas com plasma contendo FvW. A essa mistura é acrescentada a Ristocetina, antibiótico que auxilia a interação do FvW e as glicoproteína Ib (GPIb) das plaquetas.

**Figura 2** – Representação esquemática da reação de aglutinação



Fonte: Autoria própria

### Reagentes necessários

- ▶ Plasma referência
- ▶ Plaquetas fixadas
- ▶ Ristocetina
- ▶ 100 mg do reagente Ristocetina são diluídos em 3,3 mL de solução fisiológica (SF).
- ▶ Solução estoque 30 mg/mL é congelada a  $-70^{\circ}\text{C}$  em volumes de  $100\mu\text{L}$ .
- ▶ Solução de uso: 0,65 mL de SF em 0,1 mL da solução estoque =  $4\text{mg/mL}$
- ▶ Albumina 6 g % em tampão citrato-salina (tampão albumina)

20 mL de tampão citrato-salina (uma parte citrato Trissódico 0,11M : cinco partes de solução salina) com 1,2 g de albumina de soro bovino

### Procedimento

- ▶ Diluir o plasma referência e plasmas testes com tampão albumina
  - Plasma referência: 1/2 (100%); 1/4(50%); 1/8(25%)
  - Plasmas testes: 1/2; 1/4; 1/8
- ▶ Realizar o teste em temperatura ambiente para cada uma das diluições

- ▶ Em um tubo de vidro adicionar:
  - 0.2 mL de plaquetas lavadas e fixadas contendo  $800 \times 10^9$  plaquetas /L
  - 0.1 mL plasma diluído
  - Homogeneizar, evitando a formação de bolhas
  - Adicionar 0.1 mL de Ristocetina (4 mg/mL)  
*Obs.: a concentração final da ristocetina na reação será de 1 mg/mL*
- ▶ Acionar o cronômetro e inclinar o tubo de um lado para o outro  
*Obs.: para melhor visualização colocar o tubo sobre um fundo escuro e ao lado de uma fonte luminosa.*
- ▶ Registrar o tempo em que se formou um aglutinado visivelmente grande
- ▶ Fazer cada diluição em duplicata, ou em triplicata quando a diferença entre as duplicatas for maior que 10%.

**Controle:** 0,2 mL de plaquetas + 0,1 mL ristocetina + 0,1 ml tampão > 60min

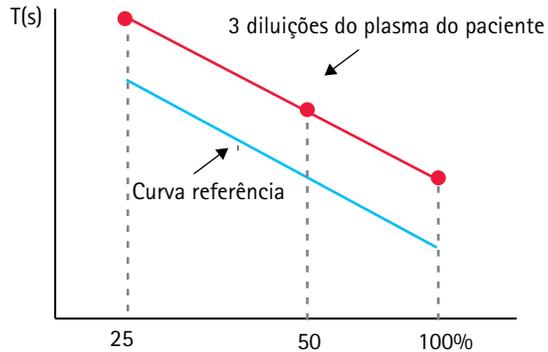
#### Cálculos

Utilizar papel em escala log-log de dois ciclos. Plotar os tempos de aglutinação do plasma referência versus a concentração.

A atividade do cofator de ristocetina do plasma do paciente é obtida a partir da curva referência e corrigida pela diluição.

O valor normal deve ser estabelecido em cada laboratório, mas geralmente se encontra entre 50 a 150%.

**Gráfico 2** – Cálculo do cofator de ristocetina do paciente a partir da curva de calibração



Fonte: Autoria própria

Preparo de plaquetas formolizadas

**Quadro 6** – Soluções utilizadas para o preparo de plaquetas fixadas

Solução de EDTA 0.2%	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 2 g EDTA disódico</li> <li>- 8.5 g NaCl</li> <li>- H2O destilada q.s.p. 1L</li> <li>Acertar o pH da solução para 6.4</li> </ul>
Solução de fixação	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 ml de solução de formaldeído a 40% ou 22,2 ml de solução de formaldeído a 36%</li> <li>- 0.2 g EDTA disódico;</li> <li>- 8.5 g NaCl;</li> <li>- 0.4 g fosfato hidrogênio disódico;</li> <li>- 1.1g fosfatodihidrogêniosódico dihidratado</li> <li>- H2O destilada q.s.p. 1L</li> <li>Acertar o pH da solução para 6.4</li> </ul>
Solução de lavagem das plaquetas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 parte de solução de citrato Trisódico 3.8%</li> <li>- 5 partes de solução fisiológica</li> <li>Acertar o pH da solução para 6.4</li> </ul>
Solução de suspensão das plaquetas	Solução de lavagem em pH = 7.4

*Continua*

### Continuação

Solução de estocagem das plaquetas	- 0.2 g EDTA disódico; - 8.5 g NaCl; 0.1 g azida sódica - H <sub>2</sub> O destilada q.s.p. 1 L Acertar o pH da solução para 6.4
------------------------------------	---

Fonte: Kitchen, S., 2010

### Procedimento

- ▶ Coletar o sangue em citrato de sódio 0.109M e preparar o plasma rico em plaquetas (PRP-centrifugar o sangue total citratado a 150 g por 10 minutos).
- ▶ Transferir o PRP para um tubo plástico, tampar, deixar em repouso a temperatura ambiente por uma hora,
- ▶ Transferir o tubo tampado para o banho-maria a 37°C e incubar por uma hora.
- ▶ Misturar nove partes do PRP com uma parte de solução de EDTA e deixar por dez minutos a temperatura ambiente.
- ▶ Adicionar o mesmo volume contido no tubo de solução de fixação e manter a 4°C *overnight*.
- ▶ Centrifugar a 280 g por 20 minutos.
- ▶ Descartar o sobrenadante.
- ▶ Ressuspender as plaquetas em 2% do volume inicial do PRP com solução de lavagem.
- ▶ Acrescentar solução de lavagem um volume equivalente a 25% do volume inicial do PRP.
- ▶ Manter a plaquetas ressuspensas a 4°C por uma hora.
- ▶ Centrifugar a 280 g por 20 minutos, descartar o sobrenadante, ressuspender as plaquetas com a solução de suspensão para uso imediato. Caso contrário, ressuspender as plaquetas com solução de estoque e manter a 4°C até o uso.
- ▶ A concentração de ressuspensão deve ser de aproximadamente  $800 \times 10^9$  plaquetas/l.

*Obs: As plaquetas estocadas a 4°C naturalmente se sedimentam. Antes de iniciar o experimento, remover a solução estoque por centrifugação e reconstituir, com igual volume, com a solução de suspensão. As plaquetas fixadas mantidas a 4°C têm estabilidade de aproximadamente dois meses*

## Interpretação

O FvW:RCo na DvW tipo 3 é indetectável por todos os métodos citados devido à ausência ou a baixa quantidade do FvW:Ag. Nos pacientes com estrutura normal do FvW (tipo 1), os valores são proporcionais aos do FvW:Ag. Níveis plasmáticos do FvW:RCo desproporcionais em relação aos de FvW:Ag (normalmente encontra-se relação  $<0.70$ ) são característicos do tipo 2 da doença com exceção do subtipo 2N.

A determinação da atividade do cofator de ristocetina é um teste imprescindível para o diagnóstico da DvW, pois todos os tipos e subtipos (exceto 2N) apresentam atividade abaixo da normalidade.

## Teste de ligação do fator de von Willebrand ao colágeno

### Princípio

O FvW do plasma teste se liga ao colágeno ligado aos orifícios da microplaca de Elisa que foi previamente sensibilizada. A segunda reação é a de ligação dos multímeros do FvW, capturados pelo colágeno, ao anticorpo secundário anti-FvW conjugado à enzima peroxidase. A atividade de ligação é determinada por adição do substrato específico da enzima. A intensidade de cor desenvolvida na reação é proporcional à quantidade de multímeros de alto peso molecular presente no plasma teste.

### Reagentes e materiais

- ▶ Colágeno tipo I + III
- ▶ Anticorpo de coelho anti-FvW humano conjugado com peroxidase
- ▶ Tris básico
- ▶ NaCl
- ▶ Tween 20
- ▶ Albumina
- ▶ Citrato Trissódico
- ▶ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- ▶ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
- ▶ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%
- ▶ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M
- ▶ Orto-diamino- fenileno (1,2-benzenodiamino) – OPD

- ▶ Microplaca com 96 orifícios
- ▶ Micropipetas de 1.000 µl e 200 µl
- ▶ Micropipeta multicanal 200 µl

**Quadro 7** – Preparo de soluções para o teste FvW:CB

<b>Tampão de cobertura para sensibilização da microplaca de Elisa, pH 7.4</b>	
Tris básico . . . . .	20 mM
NaCl . . . . .	100 mM
Albumina . . . . .	5%
<b>Tampão de lavagem da placa, pH = 7.4</b>	
Tris HCl . . . . .	20 mM
NaCl . . . . .	100 mM
Tween 20 . . . . .	0.1%
<b>Tampão de diluição das amostras e plasma calibrador</b>	
Tampão de lavagem . . . . .	50 ml
Albumina . . . . .	0.1%
<b>Tampão do substrato OPD, pH 5.5 reajustado com H3PO4</b>	
Citrato Trissódico . . . . .	22 mM
Na2HPO4 . . . . .	50 mM

Fonte: Silva, S. S. S. C, 2002

**Procedimento**

- ▶ Revestir a microplaca com 110 µl da solução de colágeno (25 µg/ml)
- ▶ Incubar por 18 horas à temperatura ambiente
- ▶ Lavar a placa 3 vezes com o tampão de lavagem
- ▶ Revestir a microplaca com 220 µl de tampão de cobertura
- ▶ Agitar a 150 rpm por 1 hora à temperatura ambiente
- ▶ Lavar a microplaca 3 vezes com o tampão de lavagem
- ▶ Preparar as amostras e curva referência (ver a seguir)
- ▶ Curva de referência
- ▶ Diluir o plasma referência com o tampão de diluição
  - 1:50 (10 µl do plasma + 490 µl de tampão de diluição)
  - 1:100 (100 µl 1:50 + 100 µl de tampão de diluição)
  - 1:200 (100 µl 1:100 + 100 µl de tampão de diluição)
  - 1:400 (100 µl 1:200 + 100 µl de tampão de diluição)
  - 1:800 (100 µl 1:400 + 100 µl de tampão de diluição)
  - 1:1.600 (100 µl 1:800 + 100 µl de tampão de diluição)
  - 1:3.200 (100 µl 1:1.600 + 100 µl de tampão de diluição)

- ▶ Diluição das amostras teste
  - Se os níveis do FvW:Ag da amostra teste forem normais, diluir 1:100 e 1:200 com o tampão de diluição; se os níveis do FvW:Ag da amostra teste forem baixos, diluir 1:50 e 1:100 com tampão de diluição; se os níveis do FvW:Ag da amostra teste forem muito baixos, diluir 1:20 e 1:40 com tampão de diluição; se os níveis do FvW:Ag da amostra teste forem muito altos, diluir 1:200 e 1:400 com tampão de diluição.
- ▶ Adicionar, na microplaca, em duplicata, 100 µl de cada diluição do plasma referência e das amostras teste.
- ▶ Incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
- ▶ Lavar a microplaca 3 vezes com tampão de lavagem.
- ▶ Preparo do anticorpo secundário
  - Diluir o anticorpo secundário com o tampão de diluição (1 µg/ml)
  - Adicionar em todos os orifícios 100 µl de anticorpo secundário diluído.
  - Incubar a placa por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação (a 150 rpm).
  - Lavar a microplaca 3 vezes com tampão de lavagem
- ▶ Preparo do substrato cromogênico (no momento do uso)
- ▶ Solução de OPD – 400 µg/ml em tampão do substrato cromogênico
- ▶ Adicionar 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para cada 12,5 ml de solução de OPD
- ▶ Adicionar 100 µl do substrato em todos os orifícios.
- ▶ Incubar a microplaca ao abrigo de luz por aproximadamente 20 minutos.
- ▶ Parar a reação com adição de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M em todos os orifícios.
- ▶ Após 15 minutos fazer a leitura colorimétrica a 492 nm
- ▶ Calcular a percentagem do FvW:CB a partir da curva referência traçada em papel mono-log (atividade versus densidade óptica)

#### Interpretação

Os pacientes com mutação no domínio A3 do FvW, apresentam a relação dos testes dos testes FvW:CB/FvW:Ag desproporcional (< 0.7) e proporcionalidade na relação FvW:RCo/FvW:Ag (0.7 – 1.2).

A DvW do subtipo 2A apresenta relação FvW:CB/FvW:Ag e relação FvW:RCo/FvW:Ag é menor que 0.7. Isso é devido à ausência dos multímeros de alto peso molecular.

O subtipo 2M (presença de todos os multímeros) apresenta a relação FvW:CB/FvW:Ag proporcional, porém desproporção na relação FvW:RCo/FvW:Ag.

### 9.1.4.3 Testes especiais

#### Agregação plaquetária com ristocetina

A RIPA é avaliada por adição de diferentes concentrações de ristocetina ao plasma rico em plaquetas do paciente em investigação. O teste é realizado com o auxílio de agregômetro de leitura óptica acoplado a um registrador. Os resultados são expressos como a concentração de ristocetina (mg/ml) capaz de induzir 30% de agregação.

Outra forma de avaliação é a utilização de duas únicas concentrações finais de ristocetina (0.6 e 1.2 mg/ml ) para a diferenciação de DvW subtipo 2B , pseudo von Willebrand ou DvW plaquetária do subtipo 2B

#### Técnica

##### Materiais e reagentes

- ▶ Tubos plásticos de 10 ml
- ▶ Pipetas automáticas de 1.000 µl e 20 µl
- ▶ Agregômetro acoplado a um registrador
- ▶ Ristocetina 25 mg/ml
- ▶ Régua de 30 cm

#### Procedimento

Para a realização do teste, o sangue do paciente e do controle do dia deve ser colhido em citrato de sódio 3.2% (1 volume de anticoagulante para 9 volumes de sangue). Após homogeneização, o sangue é centrifugado a 150 x g por 10 minutos à temperatura ambiente para obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP) e colocado em tubo plástico. O tempo entre a coleta da amostra e a realização do teste não deve exceder de 3 a 4 horas.

O registrador acoplado ao agregômetro deve ser reajustado à velocidade de corrida do papel de 2 cm/minuto e o agregômetro calibrado para 100% de transmitância com plasma pobre em plaquetas (PPP) e 0% com o plasma rico em plaquetas (PRP).

Um volume de 400 µl de PRP é adicionado no tubo de agregação e em seguida a ristocetina 25 mg/ml em concentrações finais que variam de 0.7 a 1.2 mg/ml para induzir 30% de aglutinação, que em papéis convencionais de registrador de agregômetro, corresponde a 4.8 cm.

#### Interpretação

A agregação plaquetária dos pacientes que apresentam 30% de agregação com concentrações acima de 1.2 mg/ml são consideradas hipoaglutinantes (a maioria dos tipos e sub tipos da doença). Já os que apresentam 30% de agregação com concentrações abaixo de 0.7 mg/ml são consideradas hiperaglutinantes (subtipo 2B e pseudo DvW).

A obtenção de resposta normal à ristocetina não descarta a doença, pois a DvW tipo1 "plaqueta normal" apresenta agregação normal com ristocetina.

#### Diferenciação laboratorial entre DvW 2B e pseudo doença de von Willebrand

A DvW subtipo 2B e a pseudo DvW ou DvW tipo plaquetário são hereditárias com padrões fenotípicos e sintomas clínicos semelhantes, mas com diferentes etiologias.

A DvW subtipo 2B está associada a mutações que levam a um ganho de função do FvW. Essas mutações aumentam a ligação do FvW ao receptor plaquetário Gplb, resultando na interação espontânea do FvW a plaquetas, na circulação, o que não ocorre com o FvW normal. Já na pseudo DvW ocorre uma maior ligação de FvW normal ao receptor Ib anormal da plaqueta. Ambas as patologias apresentam resposta aumentada de agregação plaquetária induzida pela ristocetina (0.3 a 0.6 mg/ml).

A diferenciação laboratorial pode ser feita por teste de agregação plaquetária ou biologia molecular.

Teste de agregação plaquetária com 0.5 mg/ml de ristocetina

- ▶ Verificar se as plaquetas do paciente em investigação não apresentam agregação espontânea. Caso haja agregação espontânea, as duas doenças estão descartadas.
- ▶ Centrifugar o sangue do paciente e de um indivíduo normal a 120 x g por 10 minutos para a obtenção do PRP, que deve ser mantido a temperatura ambiente.
- ▶ O restante do sangue, tanto do paciente quanto do indivíduo normal, deve ser centrifugado a 1.200 x g para a obtenção do PPP.
- ▶ Transferir os PRPs com auxílio de pipeta plástica para dois tubos cônicos distintos e ajustar o pH a 6.4 com ácido cítrico 0.2 M
- ▶ Retirar 1 ml de PRP, tanto do paciente quanto do indivíduo normal, lavar 3 vezes por centrifugação a 1.200 x g com tampão Tyrode pH 6.4 (8.0 g NaCl; 0.2 g KCl; 0.065 g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0.415 g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O; 1.0 g NaHCO<sub>3</sub>)
- ▶ Cuidadosamente ressuspender as plaquetas lavadas do paciente em 1 ml de plasma do indivíduo normal e as plaquetas lavadas do indivíduo normal em 1 ml de plasma do paciente
- ▶ Repetir a agregação plaquetária com ristocetina na concentração final de 0.5 mg/ml, tanto das plaquetas ressuspensas no plasma do indivíduo normal quanto às plaquetas do indivíduo normal ressuspensas no plasma do paciente

**Quadro 8** – Diferenciação laboratorial de doença de Von Willebrand subtipo 2B e pseudo doença de von Willebrand por agregação plaquetária com ristocetina na concentração final de 0.5 mg/ml

PRP paciente +	Plaquetas lavadas do paciente +	Plaquetas lavadas do normal +
PPP paciente	PPP do indivíduo normal	PPP do paciente
Positivo	Negativo	Positivo = DvW 2B
Positivo	Positivo	Negativo = Pseudo DvW

Abreviação: DvW: doença de von Willebrand; PRP: plasma rico em plaquetas; PPP: plasma pobre em plaquetas

Fonte: Kitchen S. e Col., 2010

## Ligação do fator de von Willebrand ao fator VIII

### Princípio

A avaliação da ligação do fator VIII:C ao FvW é realizada por métodos imunológico e cromogênico. O teste é realizado em duas microplacas distintas. Na primeira é determinado o FvW:Ag e na segunda é avaliada a ligação do fator VIII:C ao FvW.

O teste de ligação fator VIII:C-FvW se inicia pela captura do FvW do paciente através de anticorpo policlonal, na microplaca. Em seguida, o fator VIII:C endógeno é removido e substituído por fator VIII recombinante em concentração definida. A quantidade de fator VIII recombinante pode ser determinada por método cromogênico.

Os níveis de fator VIII recombinante que foram ligados ao FvW são relacionados com a quantidade de FvW:Ag do paciente.

### Técnica

#### Preparo das microplacas para as reações

##### Dia 1

- ▶ Revestir duas microplacas (1 e 2) de Elisa com anticorpo anti-FvW (7 a 10 µg/ml)
- ▶ Pipetar 125 µl do anticorpo em cada orifício, na microplaca 2 deixando as duas últimas colunas vazias.
- ▶ Manter a microplaca em geladeira a 4 °C até o dia seguinte

##### Dia 2

- ▶ Lavar a microplaca 3 vezes com o tampão de lavagem (1), o mesmo utilizado para determinação do FvW:Ag
- ▶ Pipetar 250 µl do tampão de cobertura, o mesmo utilizado na determinação do FvW:Ag adicionado de 3% de albumina bovina
- ▶ Incubar 3 horas à temperatura ambiente
- ▶ Lavar a microplaca 3 vezes com o tampão de lavagem (1)
- ▶ Diluir as amostras (1/25) e o plasma referência para a execução da curva de calibração em tampão de diluição utilizado na determinação do FvW:Ag 1/25; 1/50; 1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1600 o que corresponde a 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,15% e 1.07%, respectivamente

## Dia 3

### Determinação de FvW:Ag e ligação FVIII:C – FvW:

- ▶ Na placa 1 fazer a determinação do FvW:Ag
- ▶ Na placa 2 adicionar 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,35M
- ▶ Incubar à temperatura ambiente por 60 minutos sob agitação a 100 rpm
- ▶ Lavar a microplaca com tampão de lavagem (1) 6 vezes
- ▶ Adicionar 125 µl de anticorpo de coelho anti-FvW humano na concentração de 0.43 mg/ml de proteína diluído em tampão de diluição de anticorpo, o mesmo utilizado na determinação do FvW:Ag
- ▶ Incubar a microplaca sob agitação a 370C por 30 minutos
- ▶ Lavar a microplaca com o tampão de lavagem (1) por 3 vezes
- ▶ Adicionar 100 µl de fator VIII recombinante de concentração de 1 U/ml diluído 1:400 em PBS contendo albumina a 2% e 0.1% de Tween 20
- ▶ Incubar a microplaca por 2 horas a 370 C
- ▶ Lavar a microplaca 3 vezes com tampão de lavagem (1)
- ▶ Adicionar 25 µl do tampão de diluição de amostra que acompanha o kit de determinação de fator VIII:C por substrato cromogênico
- ▶ Nas duas últimas colunas, que até então estavam vazias, adicionar 25 µl, em duplicata, das seguintes diluições do plasma referência no mesmo tampão de diluição das amostras: 1/5; 1/10; 1/20; 1/40; 1/80; 1/160; 1/320 e 1/640. Reservar dois orifícios para o branco (somente tampão de diluição)
- ▶ A seqüência de determinação deve ser seguida de acordo com o kit comercial cromogênico de determinação do fator VIII:C

### Interpretação

Os pacientes com DvW 2N apresentam níveis normais de FvW:Ag e FvW:RCo e estrutura multimérica normal, porém baixos níveis de fator VIII:C. O fenótipo é semelhante ao da hemofilia A, mas a herança genética não é ligada ao cromossomo X, sendo autossômica recessiva.

### Padrão multimérico do fator de von Willebrand

O FvW é composto por subunidades diméricas ligadas entre si por pontes dissulfeto formando complexos multiméricos de baixo, intermediário e alto peso molecular variando de  $8 \times 10^5$  a  $15 \times 10^6$  daltons.

A separação eletroforética em gel de agarose dos multímeros do FvW e a visualização são utilizadas para distinguir os diferentes subtipos da doença, principalmente os subtipos 2A, 2B e 2M.

#### Princípio

O estudo do padrão multimérico do FvW é realizado por diferentes metodologias complexas com utilização de equipamentos sofisticados e reagentes caros, tornando-o viável apenas aos laboratórios especializados.

De forma geral, o padrão multimérico é avaliado através de eletroforese utilizando gel de agarose de 1% a 3% na presença de sulfato de dodecil sódico (SDS). Os multímeros são separados, inicialmente, de acordo com o peso molecular. Em seguida são transferidos para uma membrana de PVDF ou nitrocelulose, onde será realizada a reação com anticorpo primário (coelho anti-humano) e secundário (anti-FvW conjugado com peroxidase). Até há pouco tempo, os multímeros eram visualizados diretamente no gel de corrida com a adição de anticorpo radioativo, mas atualmente esta técnica está sendo abandonada, e substituída por substratos cromogênicos para enzimas conjugadas (luminol). O padrão multimérico normal apresenta uma série de bandas divididas em grupos de baixo, intermediário e alto peso molecular.

Reagentes, materiais e equipamentos utilizados para análise do padrão multimérico.

#### Reagentes

- ▶ Agarose SeaKem HGT (P) HGT
- ▶ SDS (sulfato de duodecil sódico)
- ▶ EDTA
- ▶ Citrato de sódio
- ▶ Fosfato dissódico
- ▶ Glicerol
- ▶ Tris base
- ▶ Glicina
- ▶ Metanol
- ▶ Tween 20
- ▶ NaCl

- ▶ Azul de bromofenol
- ▶ Glicerol
- ▶ Iodoacetamina
- ▶ ECL Western blotting detection 1 e 2 (Amerrsham Life Science Ltda)
- ▶ Anticorpo de coelho anti-humano
- ▶ Anticorpo de camundongo (ou equino) anti-coelho conjugado com peroxidase
- ▶ Leite desnatado

#### Equipamentos

- ▶ Cuba de eletroforese com refrigeração
- ▶ Fonte de eletroforese
- ▶ Cuba de transferência (horizontal) com refrigeração
- ▶ Agitador orbital de placa
- ▶ Materiais
- ▶ Membrana de PVDF 0.45 $\mu$  (polyvinylidene fluoride)
- ▶ Cassete para autoradiografia
- ▶ Papel filtro 3 mm

#### Técnica

Krizek DR e Rick ME descrevem um método de visualizar os multímeros do FvW que, segundo os autores, é rápido em relação aos métodos descritos anteriormente.

#### Interpretação

Tipo 1 – presença de todos os pesos moleculares, porém com quantidades reduzidas

Tipo 2 – ausência dos multímeros de alto peso molecular, exceto no subtipo 2M, que apresenta padrão multimérico normal

Tipo 3 – ausência ou redução significativa de todos os pesos moleculares

#### Considerações

Vários fatores podem alterar os níveis plasmáticos do FvW e conseqüentemente dificultar o diagnóstico da doença. Um deles é o grupo sanguíneo ABO. Indivíduos com tipo sanguíneo O apresentam níveis plasmáticos de

FvW:Ag, fator VIII:C e FvW:RCo reduzidos em aproximadamente 25% em relação aos dos outros tipos sanguíneos e, muitas vezes, são equivocadamente diagnosticados como DvW do tipo 1. O maior determinante do diagnóstico, nesses casos, é a manifestação hemorrágica.

Situações como estresse, cirurgia, exercício físico, processo inflamatório, gravidez, uso contraceptivos orais, podem aumentar os níveis plasmáticos do FvW mascarando seus valores basais. Foi também demonstrado que os níveis de FvW variam com o ciclo menstrual e valores mais baixos são detectados entre os dias 1 a 4 do ciclo.

Diante das possíveis variações do FvW, a repetição dos testes laboratorial é quase uma constante, principalmente nos casos em que o paciente apresenta sinais e sintomas característicos da doença.

Além disso, as etapas pré-analíticas como, coleta e processamento do sangue, podem comprometer significativamente os resultados.

### 9.1.5 Recomendações para coleta e processamento da amostra para os teste de diagnóstico de doença de von Willebrand

**Condições de flebotomia:** A flebotomia deve ser a menos traumática possível e com garroteamento por até um minuto. Isto limita a liberação de fator tecidual no sítio de punção e, conseqüentemente, a ativação dos fatores de coagulação e liberação de FvW.

**Estresse do paciente:** crianças que se debatem, choram durante a coleta de sangue ou adultos ansiosos podem apresentar níveis falsamente elevados de FvW e fator VIII:C.

Além das etapas pré-analíticas que podem alterar os resultados, os testes laboratoriais utilizados no diagnóstico da DvW também apresentam variabilidades consideráveis.

O teste FvW:RCo apresenta um coeficiente de variação (CV) de 20 a 30%, sendo este ainda maior quando a atividade do FvW estiver entre 12%-15%. Altos CV também são detectados nos testes de determinação do FvW:Ag e FVIII:C (10 – 20%).

As várias condições do paciente que podem levar a níveis aumentados de FvW e fator VIII:C associadas aos possíveis erros de coleta e processamento da amostra e aos altos CV das determinações desses fatores, podem dificultar o diagnóstico da DvW assim como na sua tipagem e subtipagem.

## 9.2 Hemofilia

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária caracterizada pela deficiência dos fatores VIII (hemofilia A) ou IX (hemofilia B). Da totalidade dos casos, as hemofilias A e B compõem 70%-85% e 15%-30% dos casos, respectivamente. Os genes que codificam os fatores VIII e IX estão localizados no cromossomo X. Desta forma, a doença afeta quase que exclusivamente indivíduos do sexo masculino, enquanto que a mulher portadora é habitualmente assintomática. A apresentação clínica é semelhante para as duas deficiências e é caracterizada por sangramento intra-articular (hemartrose), hemorragia muscular ou em outros tecidos ou cavidades e sistema nervoso central. De acordo com os níveis circulantes dos fatores VIII ou IX, se <1%, 1-5% ou >5 a >40%, a hemofilia é classificada como grave, moderada ou leve, respectivamente.

Uma complicação que pode ser decorrente do tratamento da hemofilia é o desenvolvimento de anticorpos neutralizantes da função coagulante do FVIII ou FIX. A presença destes anticorpos, conhecidos como inibidores, dificulta a indução de hemostasia terapêutica com concentrado de fatores prejudicando o tratamento do paciente. A prevalência de inibidores varia de 1% a 5% entre pacientes com hemofilia B e de 10% a 30% entre pacientes com hemofilia A. Pacientes com hemofilia e inibidor apresentam sangramento mais duradouro e potencialmente de maior gravidade, além de requerer o uso de concentrados de fatores do tipo "bypassing", que são mais onerosos. A determinação dos inibidores deve ser realizada em todos os pacientes com hemofilia ao diagnóstico, antes e depois de procedimentos cirúrgicos e com periodicidade mínima a cada 6 meses se o paciente estiver em tratamento com reposição de concentrado de fatores ou hemocomponentes.

## 9.2.1 Diagnóstico laboratorial da hemofilia

O diagnóstico laboratorial das hemofilias A e B consiste na realização dos testes. TTPA (teste de triagem), determinação de FVIII: C e/ou FIX: C, pesquisa e quantificação de inibidor. Os testes seguem características específicas que serão abordadas em tópicos distintos a seguir.

### 9.2.1.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado

Como já descrito no capítulo 8.2, o teste de TTPA consiste na recalcificação do plasma na presença de grande quantidade de fosfolípido e de um ativador do sistema de contato. Desta forma é um teste de triagem universalmente aceito para identificar anomalias no sistema intrínseco da coagulação, e, portanto, para o diagnóstico das hemofilias A e B.

### 9.2.1.2 Determinação da atividade coagulante dos fatores VIII e IX

A determinação dos níveis de FVIII: C ou FIX: C é fundamental para o diagnóstico das hemofilias. A determinação dos níveis permite a classificação de gravidade das hemofilias, que orientará o acompanhamento e tratamento.

Para a determinação do FVIII:C há atualmente dois métodos disponíveis: (1) o método de um estágio, conhecido como coagulométrico e (2) o método de dois estágios, substituído pelo método cromogênico. Para o FIX: C encontra-se disponível apenas o método (1).

O método cromogênico é o mais recomendado para o diagnóstico de hemofilia devido a sua melhor reprodutibilidade quanto ao limite inferior da curva. Este método não depende de substrato deficiente de fator, eliminado, assim, possíveis interferências de fator VIII residual. Além disso, o teste não é influenciado pela presença de anticoagulante lúpico e pode ser utilizado para distinguir entre inibidor de fator VIII e anticoagulante lúpico em pacientes com deficiência de fator VIII adquirido. Por último, o teste não sofre influência de reagentes específicos do método coagulométrico, tal como o TTPA.

Aproximadamente 30% de pacientes com hemofilia A leve causada por mutação missense apresentam discrepância de resultado quando os dois métodos são comparados. Normalmente, a atividade de fator no método cromogênico é menor comparada com o resultado no método de um está-

gio. Pelo menos 17 mutações diferentes foram identificadas em associação com esta discrepância entre os testes. Contudo, os reagentes para teste cromogênico do fator VIII têm um custo maior quando comparado ao método de um estágio. Assim, o teste de um estágio é ainda o método mais amplamente utilizado para a determinação dos níveis do FVIII:C. Para que se possa diminuir todas as interferências do teste, pontos relevantes para uma melhor qualidade da análise serão abordados a seguir.

O método de um estágio é baseado na habilidade de uma amostra do paciente diluída encurtar o tempo de coagulação em um meio que adiciona plasma deficiente em fator VIII ou IX, reagente para TTPA (fosfolípido e ativador de contato) e cálcio. Devido a todos os fatores estarem em excesso em relação ao fator VIII ou IX, o tempo de coagulação desta mistura é principalmente afetado pela atividade de fator VIII ou IX. Neste caso, o tempo de coagulação reflete o resultado em uma linha linear entre o tempo de coagulação (escala linear) e diluição do plasma padrão (escala logarítmica). Um importante pré-requisito para este ensaio é o paralelismo das diluições do calibrador com as diluições do plasma do paciente. O não-paralelismo pode indicar a presença de um inibidor ou a presença de algum fator que não faz parte da reação normal. Neste caso, o resultado desta análise não deve ser considerado. Conseqüentemente, o resultado do FVIII:C deve ser realizado em pelo menos três diluições diferentes para análise deste paralelismo. Muitas variáveis podem influenciar este ensaio e contribuir para um indesejável alto coeficiente de variação e um desacordo na exatidão do teste. Para a minimização deste problema, deve-se avaliar:

### **A- Plasma de referência**

A atividade do FVIII: C é lida através de uma curva de calibração de um plasma de referência, que representa a correlação entre o tempo de coagulação e o FVIII:C. A atividade de FVIII:C no plasma é expressa em UI dL<sup>-1</sup>, onde 100 UI é definido como atividade que é presente em 1 dL de pool de plasma normal. A estimativa pode alterar o verdadeiro nível de FVIII:C. Por isso, é fortemente recomendado a calibração do plasma de referência contra um padrão internacional de fator VIII da Organização Mundial de Saúde, que pode ser obtido através do NIBSC. A calibração deve ser realizada por uma leitura paralela do plasma padrão (NIBSC) e plasma padrão local em pelo

menos quatro diluições. A potência do padrão local pode ser derivada destes ensaios quando as duas curvas mostram paralelismo.

## **B- Plasma deficiente**

Uma importante característica do teste de FVIII:C é a qualidade do plasma deficiente de fator VIII. No passado, plasmas de pacientes com hemofilia grave foram bastante utilizados para este fim. Atualmente, o fator VIII pode ser removido do plasma por procedimentos químico ou imunológico. A primeira condição, e a mais importante para o plasma substrato deficiente, é a absoluta certeza da ausência de fator VIII. Alguns estudos indicam que o processo de retirada imunológica pode conter maior quantidade de fator residual, sendo esta, portanto, uma das causas da dificuldade de se identificar a hemofilia A grave. Há uma forte recomendação para que se analise o FVIII:C residual do plasma deficiente e se rejeite os fabricantes com FVIII: C residual igual ou maior que 1 UI dl<sup>-1</sup>.

O segundo requerimento é a presença de excesso de todos os outros fatores, exceção feita ao fator para o qual se deseja que o substrato seja deficiente. A falta de um ou outro fator pode influenciar as informações do resultado e levar a uma curva não paralela entre o plasma referência e o plasma do paciente. A cada novo lote de reagente, deve-se testar estes dois reagentes.

Método Manual. Neste manual optou-se em descrever a técnica manual para a realização do teste, pois entende-se que a mesma deve ser o teste principal para a validação dos processos realizados no laboratório. Desta forma, a automação deve seguir a mesma característica da técnica manual.

### Material:

- ▶ Tubos de vidro;
- ▶ Banho - Maria a 37°C;
- ▶ Micropipetas automáticas de 100 µl, 200 l e 1.000 µl;
- ▶ Cronômetro.

### Reagentes:

- ▶ Plasma deficiente em fator VIII ou IX;
- ▶ Cefalina (com sílica como ativador);
- ▶ Cloreto de cálcio 0,025 M;

- ▶ Tampão imidazol, pH 7,4 ou tampão Veronal ou NaCl 0,9% (o tampão utilizado deverá ser o mesmo para a curva padrão e pacientes)

Curva de calibração:

A curva de calibração deve ter o mesmo tempo de validade que o lote do reagente utilizado. Ao se abrir um novo lote de cefalina ou de plasmas deficientes, ou ainda, se os controles normais e patológicos não estiverem dentro dos valores esperados, uma nova curva de calibração deve ser realizada.

Procedimento do teste

- ▶ Diluir o plasma padrão de referência com tampão de escolha. A diluição inicial é específica para cada fabricante do reagente de fator VIII. Sendo assim, antes de se proceder à diluição, deve-se consultar as determinações do fabricante. Veja o exemplo no quadro 9 para uma diluição inicial 1:5 recomendada por um fabricante.

**Quadro 9** – Calibração para dosagem de fator VIII

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Tampão	0,8 ml	0,5 ml	0,5 ml				
"Calibrador"	0,2 ml	-	-	-	-	-	-
Misture e transfira	0,5 ml						
Diluição	1 : 5	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320
Atividade do fator	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	1,5%

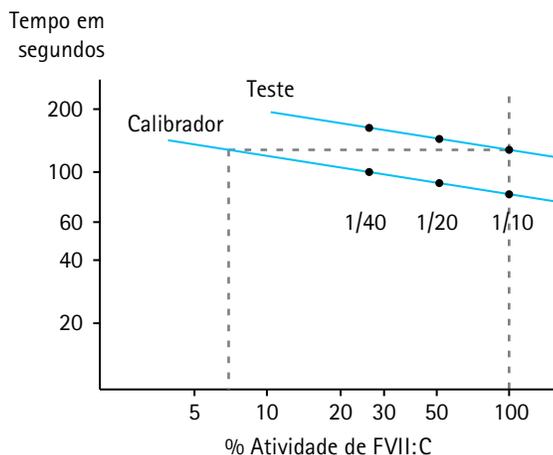
Fonte: Montalvão S.A.L, 2011

A atividade de fator da diluição inicial será correspondente a da bula do calibrador (plasma padrão de referência).

- ▶ Pipetar 0,1 mL de cada diluição do calibrador em um tubo;
- ▶ Adicionar 0,1 mL do plasma deficiente de fator VIII ou IX e 0,1 mL de cefalina. Misturar e incubar por 3 minutos a 37°C;
- ▶ Adicionar 0,1 mL de cloreto de cálcio 0,025 M pré aquecido a 37°C e disparar, simultaneamente, o cronômetro;
- ▶ Observar a formação do coágulo e parar o cronômetro ao primeiro sinal de formação da fibrina. O teste deverá ser realizado em duplicata;

- ▶ Colocar o valor encontrado (média da duplicata) no gráfico, em papel mono-log, com as porcentagens das diluições na abscissa e o tempo em segundos na ordenada;
- ▶ Marcar os pontos, traçando uma reta. Esta será a curva de calibração.
- ▶ Para a amostra teste realizar as três primeiras diluições (1/5, 1/10, 1/20) e proceder conforme os passos anteriores. A amostra teste, como já descrito, deverá ser realizada em triplicata, sendo elas em diferentes diluições.
- ▶ Resultados: o valor obtido das três diluições da amostra teste deverá ser interpolado na curva de calibração obtida. Um paralelismo entre os pontos calibrador x paciente deverá ser encontrado. Então, deve-se calcular a média dos resultados em porcentagem, respeitando um coeficiente de variação de 5% entre as diluições. O Gráfico 3 ilustra um exemplo de curva de calibração e o paralelismo.

**Gráfico 3** – Curva de calibração–paralelismo na determinação de fator específico



Fonte: Adaptado do Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual - World Federation of Hemophilia, 2000

### 9.2.1.3 Inibidores

Os testes de triagem/determinação de inibidor devem, sempre que possível, ser realizados quando os níveis plasmáticos de fator estiverem mais

baixos, isto é, de preferência, após pelo menos três dias da última infusão de concentrado de fator. Altos níveis de fator podem mascarar a detecção do inibidor. Uma vez constatada a presença de inibidor, para confirmação diagnóstica, é imprescindível uma segunda dosagem, que deverá ser realizada dentro de 3-4 semanas após a primeira dosagem. O sangue a ser colhido para o teste NÃO deve ser proveniente de veia heparinizada, cateter ou de sistemas de infusão tipo *porth-a-cath*. Para que se determine se o paciente desenvolveu um inibidor de baixa ou alta resposta é de suma importância que se façam titulações do inibidor mensalmente ou, pelo menos, a cada três meses. Esta conduta é particularmente importante quando o tratamento do paciente envolve a infusão de concentrado de fator VIII ou IX. A existência de um laboratório capacitado para realização de testes de triagem e de titulação de inibidores é essencial para que haja o acompanhamento e tratamento de pacientes com hemofilia.

### Técnicas de detecção de inibidor

São três as técnicas que podem ser realizadas para a detecção de inibidor em pacientes com hemofilia: teste de mistura, pesquisa de inibidor (ambos testes de rastreamento) e quantificação de inibidor

#### *Detecção do inibidor pelo teste de mistura*

Inibidores da coagulação que afetam o teste TTPA podem ter uma ação imediata ou ser tempo-dependente. O plasma-teste, que contém um inibidor de ação imediata, quando misturado com plasma normal (pool de plasma normal), apresenta pouca ou nenhuma correção do tempo de coagulação. No caso de inibidores tempo-dependente, que são a maioria dos inibidores em pacientes com hemofilia A congênita, a incubação por 2 horas a 37°C antes da realização do teste de mistura é fundamental para confirmação ou exclusão da presença do inibidor.

Uma boa correção (em segundos) do TTPA, após a mistura com plasma normal, deverá ser maior que 50% da diferença entre o TTPA do paciente pré-mistura e o TTPA do pool de plasma normal, conforme o exemplo do Quadro 10. Valores limítrofes podem requerer repetição do teste, pesquisa e/ou quantificação de inibidor, além de análise conjunta com os dados clínicos.

**Quadro 10** – Exemplo de cálculo da correção do TTPA pela mistura com pool de plasma normal

Amostra	TTPA em segundos
Pool de plasma normal (A)	35 segundos
Plasma Teste pré-mistura (paciente) (B)	60 segundos
Plasma teste após mistura (C)	42 segundos
Cálculo	
Correção em segundos	$B - C \ 60-42=18$
Diferença entre B e A	$60-35=25$
Análise: correção em segundos (18s) deve ser maior que 50% da diferença entre B e A	$18 > (25/2=12,5)$ Conclusão. correção eficaz

Fonte: WFH, 2000, adaptado

### *Detecção do Inibidor pelo teste de pesquisa de inibidor*

Neste tipo de teste, o pool de plasma normal e o plasma-teste são incubados separadamente a 37°C por 2 horas, assim como a mistura (volume/volume) do pool de plasma normal com o plasma-teste. O TTPA então é determinado: (1) no pool de plasma normal, (2) no plasma-teste, (3) na mistura incubada e (4) em uma nova mistura com partes iguais de plasma-teste e do pool de plasma normal (volume/volume) preparada depois da incubação (mistura imediata).

A não correção do TTPA nas misturas 3 ou 4 sugere a presença de um inibidor que poderá ser de detecção imediata (mistura 4) ou tempo-dependente (mistura 3).

### Método

- ▶ 4 tubos plásticos são preparados: A, B, C e D.
- ▶ Adicionar um volume de plasma normal (pool) no tubo A, um volume de plasma-teste no tubo B e uma proporção (volume/volume) de cada tubo (A e B) no tubo C.
- ▶ Incubar por 2 horas a 37°C.
- ▶ Fazer uma nova mistura (volume/volume) do plasma do tubo A e B adicionando esta mistura ao tubo D (Mistura imediata).
- ▶ Realizar o TTPA em duplicata no material dos tubos A, C, D e B (nesta seqüência).

## Resultados e Interpretação

Tendo em vista os possíveis resultados, alguns exemplos estão descritos no Quadro 11.

**Quadro 11** – Exemplos de resultado de testes para detecção de presença de inibidores

Amostra (tempo em segundos)	Exemplo 1	Exemplo 2	Exemplo 3
A- Plasma Normal (pool)	40	40	40
B- Plasma Teste	90	90	90
C- Plasma teste e plasma normal (mistura incubada)	45	70	70
D- Plasma teste e plasma normal (mistura imediata)	45	48	70

Fonte: World Federation of Hemophilia. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual, 2000, adaptado

Exemplo 1: Houve correção na mistura incubada e na mistura imediata. Isto sugere deficiência de fatores da via intrínseca – ausência de inibidor.

Exemplo 2: Houve correção na mistura imediata, mas não houve correção na mistura incubada. Isto sugere presença de inibidor tempo e temperatura dependente – presença de inibidor.

Exemplo 3: Não houve correção em nenhuma das misturas. Isto sugere presença de um inibidor de ação imediata – presença de inibidor.

*Obs. Para análise dos resultados, a seção Detecção do inibidor pelo teste de mistura, (p. 81) pode ser utilizada.*

## Quantificação de inibidor

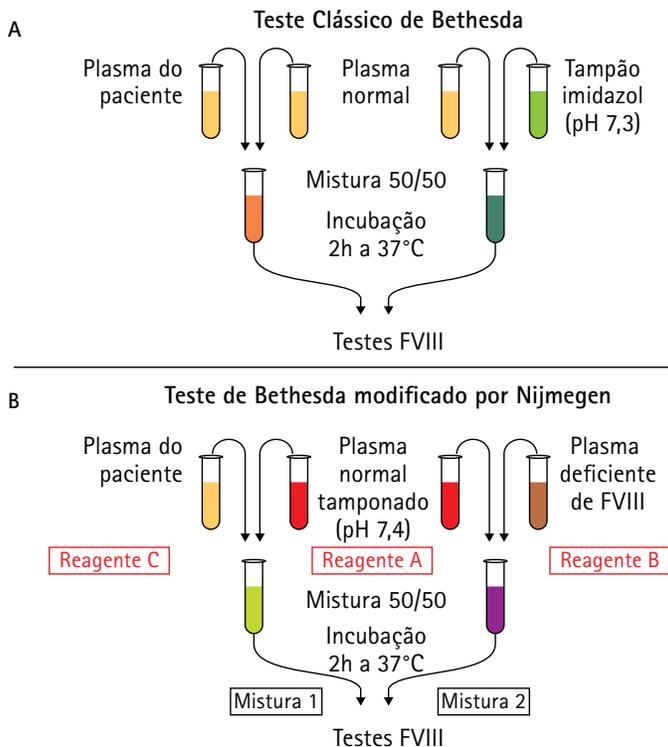
Uma vez detectada a presença do inibidor pelos testes de rastreamento relatados no capítulo anterior, torna-se imperativa a quantificação do mesmo. Vários métodos têm sido descritos para se realizar a quantificação de inibidor em hemofilia. No entanto, o método de Bethesda, inicialmente descrito por Kasper e cols. em 1975 e recentemente modificado pelo protocolo de Nijmegen (VERBRUGGEN et al., 1995) é o mais utilizado e é o recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia.

### *Método Bethesda*

A versão original ou o método clássico de Bethesda envolve a mistura da amostra do paciente com um mesmo volume de pool de plasma normal

(plasma com nível de fator VIII conhecido). Como a maior parte dos anticorpos associados a hemofilia A congênita são tempo e temperatura dependentes, a mistura deve ser incubada por 2 horas a 37°C antes de se realizar a dosagem de fator VIII. Simultaneamente, o mesmo volume do pool de plasma normal (plasma com nível de fator VIII conhecido) é misturado com o tampão diluente para uma análise em paralelo (Figura 3 A).

**Figura 3** – Ilustração esquemática dos testes de Bethesda (A) e Bethesda modificado por Nijmegen (B).



Fonte: Brasil. Ministério da Saúde. Manual de diagnósticos e tratamento de eventos hemorrágicos, 2008

#### *Método Nijmegen (Bethesda modificado)*

A variação de Nijmegen do método de Bethesda envolve duas modificações (Figura 3-B): (1) o pool de plasma normal é tamponado e estabilizado com

imidazol e (2) o plasma controle é misturado com o plasma deficiente em fator VIII ao invés de tampão com o pool de plasma normal tamponado.

Estas modificações, além de diminuir a possibilidade de falso positivo, reduzem o coeficiente de variação, em comparação com o teste clássico de Bethesda, melhorando, assim, a confiabilidade do teste. Adicionalmente, estudos mostraram que as diferentes maneiras de se obter o substrato de fator VIII comercial (por meio imunológico ou químico), quando utilizado nesta técnica, têm influência significativa nos valores obtidos de títulos de inibidor. Sendo assim, foi demonstrado que o substrato de fator VIII pode ser substituído por uma solução a 4% de soro de albumina bovina (BSA, Sigma-fraction V).

A mesma técnica poderá ser utilizada para a determinação do inibidor de fator IX, mas o tempo de incubação para esta determinação poderá ser de apenas 10 minutos, uma vez que o inibidor de fator IX não apresenta caráter tempo-dependente.

### **Técnica para realização do teste Bethesda Modificado por Nijmegen**

Preparo do plasma Controle (mistura 2)

Preparar o pool de plasma normal tamponado (reagente A): adicionar imidazol sólido (Merck, Damstadt, Germany) ao pool de plasma normal na concentração final de 0.1 M. Ajustar para o pH 7.4 com adição lenta de HCl 1 N em constante agitação do plasma a 4°C.

Mistura 2: misturar 1 parte do pool de plasma normal tamponado (reagente A) com 1 parte de plasma deficiente em FVIII ou solução a 4% de BSA (reagente B) (volume/volume).

Preparo da amostra-teste (mistura 1):

Mistura 1: misturar 1 parte do plasma do paciente (reagente C) com 1 parte de pool de plasma normal tamponado (reagente A) (volume/volume)

Repetir o procedimento anterior a fim de obter diluições 1:2, 1:4, 1:8 do plasma do paciente. Estas diluições devem ser realizadas com o plasma deficiente em fator VIII quando este for utilizado no controle (reagente B) ou a solução de 4% BSA quando esta for utilizada como controle (reagente B).

Caso haja suspeita de inibidor de alto título, estas diluições podem ser aumentadas. Exemplo:

Tubo 1: 1 volume do plasma teste diluído 1:2 com plasma deficiente em fator VIII ou solução a 4% de BSA + 1 volume do pool tamponado (reagente A).

Tubo 2: 1 volume do plasma teste diluído 1:4 com plasma deficiente em fator VIII ou solução a 4% de BSA + 1 volume do pool tamponado (reagente A).

Tubo 3: 1 volume do plasma teste diluído 1:8 com plasma deficiente em fator VIII ou solução a 4% de BSA + 1 volume do pool tamponado (reagente A).

Análise:

Incubar a mistura 1 com as suas possíveis diluições (exemplificadas acima como tubo 1, tubo 2, tubo 3) e a mistura 2 por 2 horas a 37°C.

Realizar a dosagem da atividade de FVIII:C de cada diluição (exemplificadas acima como tubo 1, tubo 2, tubo 3)

Cálculo da Quantidade de Inibidor:

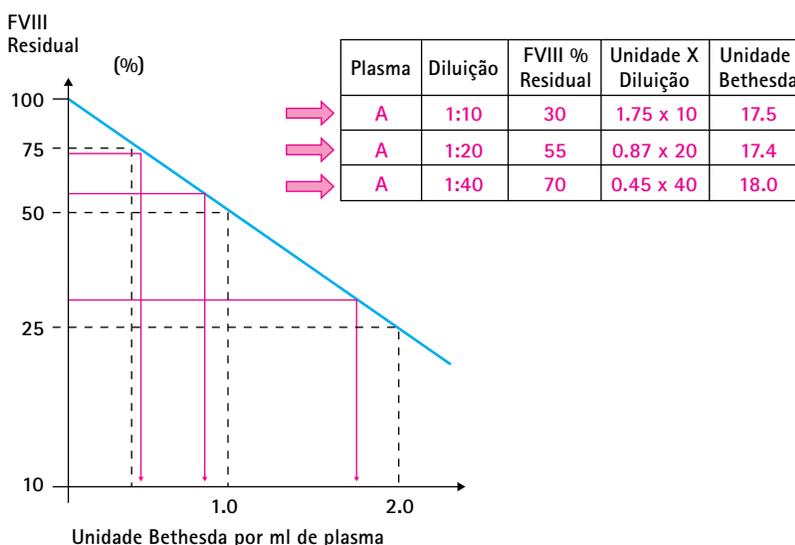
Cálculo da atividade de fator residual: o valor da atividade de fator VIII de cada diluição (mistura 2) deverá ser dividido pelo valor da atividade de fator VIII encontrado no plasma controle (mistura 1) e multiplicado por 100. A atividade residual de fator VIII versus a unidade Bethesda é plotada em papel mono – log em uma escala aritmética (Gráfico 4).

Por definição, uma unidade Bethesda corresponde à quantidade de inibidor capaz de neutralizar 50% da atividade de fator VIII plasmático, após incubação por 2 horas a 37°C. A atividade residual de 100% é o mesmo que 0 unidade Bethesda, sendo possível ter um gráfico que tenha correlação entre atividade de fator VIII residual e o título de inibidor. É importante notar que o título de inibidor deverá ser plotado em um gráfico quando a atividade de fator residual estiver entre 25 e 75% (Gráfico 4). Para o cálculo final de unidades Bethesda, deve-se considerar a diluição cujo fator residual estiver mais próximo de 50%.

Os pontos são plotados em um gráfico log – linear com valores próximos de 100%, 50% e 25% de atividade residual, correspondendo a 0, 1 e 2 Unidades Bethesda, respectivamente.

No exemplo anterior, o plasma A é testado nas diluições 1:10, 1:20 e 1:40 (estas diluições, assim como da figura a seguir são apenas um exemplo, podendo ser realizadas as diluições 1:2, 1:4, 1:8, conforme descrito anteriormente). O título final é obtido multiplicando-se o valor obtido pelo fator de diluição correspondente. Notar que as amostras evidenciaram unidades semelhantes de inibidor nas diversas diluições. Este resultado é o mais freqüentemente encontrado. No entanto, como a cinética de reação dos anticorpos pode ser variável, títulos muito diferentes de inibidores podem ser obtidos numa mesma amostra. A Gráfico 5 demonstra esse cenário.

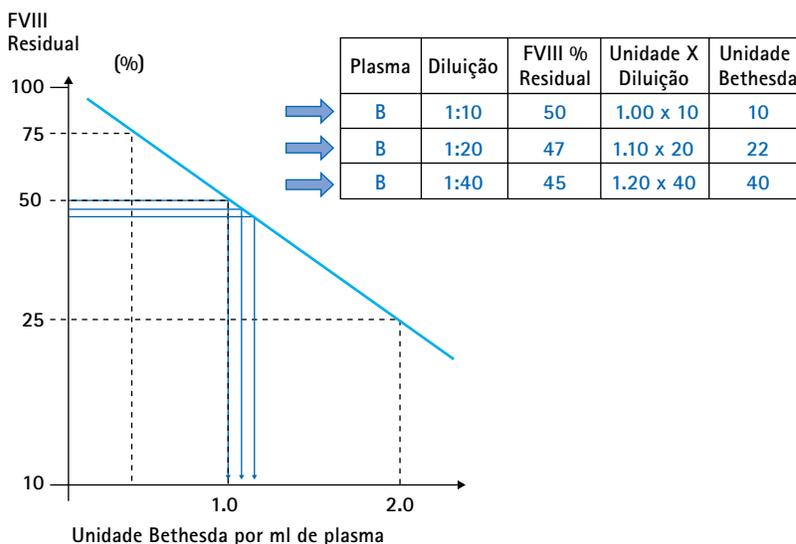
**Gráfico 4** – Exemplo 1 do cálculo da atividade residual do fator VIII



Fonte: World Federation of Hemophilia. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual, 2000, adaptado

Em casos como este, o resultado deve ser baseado na menor titulação, isto é, 1:10. Valores menores que 0,6 UB por ml de plasma são considerados negativos. No entanto, é importante que se estabeleça o valor de referência negativo em cada laboratório, através da determinação plasmática de inibidor de fator VIII em um número representativo de indivíduos normais.

**Gráfico 5** – Exemplo 2 do cálculo da atividade residual do fator VIII



Fonte: World Federation of Hemophilia. Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual, 2000, adaptado

Observação sobre os volumes usados nas reações:

Vários fatores influenciam o volume a ser usado nas reações descritas acima, entre eles método (manual x automatizado), volume de plasma disponível (adulto x criança), etc. Desta forma, o volume deve ser definido em cada laboratório, devendo ser respeitada a proporção volume a volume. Em geral, volumes na ordem de 0,2 a 1 ml são adequados para os testes.

### 9.3 Coagulopatias raras

A análise dos resultados dos testes de triagem orienta a escolha do teste de diagnóstico (dosagem específica de fator) a ser realizado subsequentemente, conforme descrito no Quadro 12.

**Quadro 12** – Correlação do teste de triagem com a dosagem específica de fator

Deficiências	TP	TTPA	Teste da Mistura
Via Extrínseca Deficiência de fator VII	prolongado	Normal	não se aplica
Via Intrínseca Deficiências de fator VIII, IX ou XI Anticorpo antifosfolípideo Anticorpos anti-VIII ou IX	Normal Freqüentemente Normal Normal	prolongado prolongado prolongado	Corrige Não há correção Pode ou não haver correção
Via Comum Deficiências Congênitas Fatores X, V ou protrombina A/Hipo/Disfibrinogenemia Hepatopatia/carência de vitamina K Moderada Grave Anticoagulantes Heparina Antivitamina K Superdosagem de Heparina/ antivitamina K	prolongado prolongado prolongado prolongado Normal prolongado prolongado	prolongado prolongado Normal prolongado prolongado Normal prolongado	Corrige Corrige ----- Corrige ----- ----- -----

Abreviações: TP, tempo de protrombina; TTPA, tempo de tromboplastina parcial ativada; TPA (1/2), Teste da Mistura

Fonte: Hématologie en pratique clinique : guide de diagnostic et de traitement. Robert S. Hillman ; Kenneth A. Ault ; Henry M. Rinder. Médecine-Sciences Flammarion, 2007

Neste capítulo, as deficiências de fatores consideradas raras serão abordadas de forma sucinta, evidenciando os métodos laboratoriais disponíveis para seu diagnóstico.

### 9.3.1 Deficiência de fator VII

A deficiência hereditária de fator VII é uma doença rara, transmitida de forma autossômica recessiva, resultando em uma doença hemorrágica de gravidade variável. A suspeita da deficiência de fator VII é levantada pelo prolongamento do TP com TTPA normal.

O nível de fator VII pode ser avaliado por meio de ensaios funcionais, como o método por coagulação em uma etapa. A leitura minuciosa das orientações

do fabricante dos reativos é importante para a realização do procedimento de acordo com as Boas Práticas de Laboratório de Coagulação (BPLC).

## Método funcional

Técnica em uma etapa:

Fundamento:

Consiste em medir o TP em uma mistura contendo a diluição do plasma a testar, um plasma substrato deficiente em fator VII, com concentração normal de todos os demais fatores da coagulação, na presença de fosfolípidos e cálcio. Pode ser realizada em banho-maria a 37°C pelo método manual, bem como, em equipamentos semi e totalmente automatizados.

Realiza-se uma curva de calibração com diluições sucessivas do pool de plasma de referência em tampão. O tipo de tromboplastina pode influenciar no resultado do teste.

Material e métodos

- ▶ Plasma Substrato deficiente em fator VII
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Tampão Imidazol, ou Veronal, ou Owren
- ▶ Plasma de referência
- ▶ Amostra teste

Deve-se reconstituir o reativo de tromboplastina de acordo com as indicações do fabricante e pré-aquecê-lo a 37°C;

Curva de calibração: deve-se realizar diluições seriadas do plasma de referência, em tampão, partindo de uma diluição de 1/5 ou 1/10 (de acordo com o fabricante), equivalendo a 100%. É aconselhável que a curva de calibração possua no mínimo 6 pontos.

Os tubos com as diluições para a curva de calibração e as do paciente a testar não devem permanecer além de 30 minutos em temperatura ambiente, podendo ser mantidos em banho de gelo.

Colocar em tubo de vidro a 37°C.

Cada diluição . . . . .100 µl

Substrato deficiente em fator VII . . . . .100 µl

Misturar e incubar por 1 minuto a 37°C e adicionar:

Tromboplastina cálcica pré aquecida a 37°C . . . . .200 µl

Medir o tempo para formação do coágulo. Realizar testes em duplicata.

#### Resultados

Plotar a percentagem da diluição na abscissa em papel di-logaritmo, e o tempo em segundo na ordenada.

#### Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

### 9.3.2 Deficiência de fator V

A deficiência do fator V foi descrita em 1947, por Owren. É uma deficiência rara, transmitida de forma autossômica recessiva, com prevalência de 1:1.000.000. O quadro clínico é variável. A condição heterozigótica geralmente não apresenta sintomatologia clínica, enquanto, a homozigótica apresenta sintomas leves, moderados ou graves. O diagnóstico é suspeitado pelo prolongamento do TP e do TTPA. O nível de fator V é avaliado em um laboratório por meio de ensaio funcional, como o método por coagulação em uma etapa, semelhante ao TP e por método imunológico.

## Método funcional

Técnica em uma etapa:

Fundamento:

Consiste em medir o TP em uma mistura contendo a diluição do plasma a testar, um plasma substrato deficiente em fator V, com concentração normal de todos os demais fatores da coagulação, na presença de fosfolípidos e cálcio. É realizada em banho-maria a 37°C por método manual, bem como, em equipamentos semi e totalmente automatizados.

Realiza-se uma curva de calibração com diluições sucessivas do plasma de referência em tampão. O tipo de tromboplastina pode influenciar no resultado do teste.

A leitura minuciosa das orientações do fabricante dos reativos é importante para a realização do procedimento de acordo com as BPLC.

Material e métodos

- ▶ Plasma Substrato deficiente em fator V
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Tampão Imidazol, ou Veronal, ou Owren
- ▶ Plasma de referência
- ▶ Amostra problema: plasma citratado pobre em plaquetas

Antes da realização dos testes, caso as amostras plasma de referência e problema estejam congeladas, devem ser descongeladas rapidamente a 37°C, principalmente em se tratando dos fatores VIII e V, que são fatores da coagulação termolábeis.

Deve-se reconstituir o reativo de tromboplastina de acordo com as indicações do fabricante, e pré-aquecê-lo a 37°C.

Curva de calibração: deve-se realizar diluições seriadas do plasma de referência, em tampão, partindo de uma diluição de 1/5 ou 1/10 (de acordo com o fabricante), equivalendo a 100%. É aconselhável que a curva de calibração possua no mínimo 6 pontos.

Os tubos com as diluições para a curva de calibração e as do paciente a testar não devem permanecer além de 30 minutos a temperatura ambiente, podendo ser mantidas em banho de gelo.

Colocar em tubo de vidro a 37°C.

Cada diluição . . . . .100 µl

Substrato deficiente em fator V . . . . .100 µl

Misturar e incubar por 1 minuto a 37°C, e adicionar.

Tromboplastina cálcica pré aquecida a 37° C . . . . .200 µl

Medir o tempo para formação do coágulo. Realizar em duplicata.

#### Resultados

Plotar a percentagem da diluição na abscissa em papel di-logaritmo, e o tempo em segundo na ordenada.

#### Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

### 9.3.3 Deficiência de fator X

O fator X ocupa uma posição única na cascata da coagulação como a primeira enzima envolvida no mecanismo comum de formação do coágulo. O fator X foi identificado na década de 50 por dois grupos independentes.

Em 1956, Teifer et al. descreveram uma tendência a sangramento em uma mulher de 22 anos de idade. Ela apresentou um tempo alterado do teste de geração de tromboplastina e TP prolongado. Após um ano, Hougie et al. descreveram parâmetros anormais da coagulação em um homem de 36 anos, que apresentava TTPA prolongado, teste de geração da tromboplastina alterado e prolongamento do teste do veneno da víbora Russell.

É um distúrbio raro, de herança autossômica recessiva, com uma incidência de 1:1.000.000 na população geral.

Vários polimorfismos, que parecem não afetar os níveis do fator, foram identificados no gene que codifica o fator X. Há pouca correlação entre a

atividade de fator X e o risco de sangramento. Classicamente, o TP e o TTPA apresentam-se prolongados.

O nível de fator X pode ser determinado por 5 diferentes exames. Exames baseados no TP, de 1 etapa, ou no TTPA são suficientes para o diagnóstico.

## Método Funcional

### Técnica em uma etapa

Este é o método mais utilizado para dosagem de fator X, que consiste na determinação do tempo de coagulação, na presença de tromboplastina, em um sistema no qual todos os fatores estão presentes, constantes e em excesso, com exceção do previsto na amostra a testar.

### Material

- ▶ Plasma substrato deficiente em fator X
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Tampão Imidazol, ou Veronal, ou Owren
- ▶ Plasma de referência
- ▶ Amostra problema: plasma citratado pobre em plaquetas

Reconstituir o reativo de tromboplastina de acordo com as indicações do fabricante e pré-aquecê-lo a 37°C;

Curva de calibração: realizar diluições seriadas do plasma de referência, em tampão, partindo de uma diluição de 1/5 ou 1/10 (de acordo com recomendação do fabricante), equivalendo a 100%. É aconselhável que a curva de calibração possua no mínimo 4 pontos.

Colocar em tubo de vidro a 37°C.

Cada diluição . . . . . 100 µl

Substrato deficiente em fator X . . . . . 100 µl

Misturar e incubar por 1 minuto a 37°C e adicionar:

Tromboplastina cálcica pré aquecida a 37° C . . . . . 200 µl

Medir o tempo para formação do coágulo. Realizar teste em duplicata.

## Resultados

Os resultados se expressam em unidades/ml (U/ml) ou em %. A cada lote de reativos deve ser realizada uma nova curva de calibração com diluições de plasma de referência em tampão.

Plotar a percentagem da diluição na abscissa em papel di-logaritmo e o tempo em segundo na ordenada.

## Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

### 9.3.4 Deficiência de fator XI

A deficiência de fator XI, também chamada de doença de Rosenthal, é transmitida por herança autossômica recessiva, afetando assim, homens e mulheres. Muito mais rara que as hemofilias A e B, apresenta incidência de 5% na população de judeus Ashkenazes da Europa Central.

Geralmente apresenta um quadro hemorrágico de moderada gravidade, podendo ser diagnosticado somente durante intervenção cirúrgica, mediante sangramento per ou pós-operatório.

### Método Funcional

#### Técnica em uma etapa

Baseia-se na técnica do TTPA cujo principio é medir o tempo de coagulação de uma mistura de ativador, substrato deficiente em fator XI, plasma a testar, fosfolípidos e cálcio.

#### Materiais e métodos:

- ▶ Plasma deficiente em fator XI
- ▶ Tampão Imidazol, pH 7,3
- ▶ Reativo para realização de TTPA
- ▶ Cloreto de Cálcio 0.025 M
- ▶ Plasma de referência

Amostra problema: plasma citratado pobre em plaquetas

Curva de calibração: realizar diluições seriadas do plasma de referência, em tampão imidazol, partindo de uma diluição de 1/10, que equivale a 100%. É aconselhável conservar estes tubos em banho de gelo até a realização do procedimento.

Colocar em tubo.

Substrato deficiente em fator XI . . . . . 50 µl  
Plasma do paciente diluído 1/10. . . . . 50 µl  
Reativo para realização de TTPA.. . . . 100 µl  
Incubar a 37°C por 1 minuto e adicionar:  
Cloreto de Cálcio 0.025 M pré aquecida a 37° C . . . . . 100 µl

Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

### 9.3.5 Deficiência de fator XII

A deficiência de fator XII é um distúrbio autossômico recessivo cujas implicações clínicas continuam controversas.

Apesar de esta deficiência resultar em TTPA prolongado, os pacientes não apresentam hemorragia, nem risco hemorrágico. Existem relatos de associação desta deficiência com trombose.

#### Método Funcional:

Técnica em uma etapa:

Materiais e métodos Plasma deficiente em fator XII

- ▶ Tampão Imidazol, pH 7,3
- ▶ Reativo para realização de TTPA
- ▶ Cloreto de Cálcio 0.025 M
- ▶ Plasma de referência
- ▶ Amostra problema: plasma citratado pobre em plaquetas

Curva de calibração: realizar diluições seriadas do plasma de referência em tampão imidazol, partindo de uma diluição de 1/10, equivalendo a 100%.

É aconselhável conservar estes tubos em banho de gelo até a realização do procedimento.

Colocar em tubo

Substrato deficiente em fator XII . . . . .	.50 µl
Plasma do paciente diluído 1/10. . . . .	.50 µl
Reativo para realização de TTPA . . . . .	.100 µl

Incubar a 37°C por 1 minuto e adicionar:

Cloreto de cálcio 0.025M pré aquecida a 37°C.. . . . .	.100 µl
--	---------

Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

### 9.3.6 Deficiência de fator XIII

A deficiência congênita de fator XIII é um distúrbio raro da coagulação, primeiramente descrito por Duckert et al., em 1960. O fator XIII é responsável pela estabilização do coágulo. A deficiência de fator XIII está associada a sangramento clínico. Nos casos graves, com menos de 5% de atividade do fator, os pacientes podem apresentar sangramento de coto umbilical ao nascimento e hemorragia intracraniana, sendo ambas as manifestações características da forma grave da doença.

O modo de herança genética parece ser autossômica recessiva, com prevalência de 1 caso para cada 1-5 milhões de habitantes. Os resultados dos testes de TP, TTPA, fibrinogênio e contagem de plaquetas estão dentro dos parâmetros de normalidade. A mensuração indireta do fator XIII através do método do princípio da solubilidade em solução de uréia 5 M ou solução de ácido acético a 1% é aceitável como um teste de triagem simples e específico, embora de metodologia demorada. Além disso, estes testes são de baixa sensibilidade, estando alterados somente nas deficiências graves de fator XIII. Assim, é desejável que testes enzimáticos de maior sensibilidade sejam realizados para confirmação, detecção de casos leves/moderados da deficiência e estudos familiares.

O quadro hemorrágico aparece somente em pessoas homozigotas com atividade de fator XIII inferior a 5%, enquanto que as heterozigotas são assintomáticas.

Procedimento teste de solubilidade do coágulo em uréia 5 M ou ácido acético 1%

Fundamento:

A fibrina formada, na ausência de fator XIII, se dissolve em uréia 5 M ou em ácido acético 1%.

Colocar em um tubo de Kahn:

Plasma do paciente . . . . . 200 µl

Solução de cloreto de cálcio 0.025 M . . . . . 200 µl

Trombina (10 UI/ml) . . . . . 100 µl

Misturar e incubar por 30 minutos a 37°C. Retirar do banho e adicionar:

Solução de uréia 5 M ou ácido acético 1% . . . . . 3 ml

Estas soluções devem ser preparadas no momento do uso.

Após tampar os tubos, misturar por inversão para favorecer que o coágulo se desprenda da parede do tubo, deixando-o em seguida em temperatura ambiente.

Observar a dissolução do coágulo após 30 minutos, 1, 2, 4 e 24 horas, após a dissolução do coágulo. Em se tratando da solução de ácido acético, observar o coágulo após 10 e 30 minutos.

O tempo de dissolução é diretamente proporcional a concentração de fator XIII presente no plasma. Este tempo de observação não deve exceder 24 horas após adição das soluções citadas.

### 9.3.7 Deficiência de fibrinogênio (fator I)

Alterações na molécula de fibrinogênio comprometem a fase final da coagulação. Estas alterações podem ser de natureza quantitativa ou qualitativa.

A hipofibrinogenemia e a afibrinogenemia são relacionadas com uma alteração quantitativa de fibrinogênio. São doenças hereditárias raras transmitidas

de modo autossômico recessivo. A disfibrinogenemia, anomalia qualitativa que resulta na produção de fibrinogênio anormal, é mais freqüente.

A classificação da deficiência é facilitada após a comparação dos resultados obtidos pelo método de Clauss, que determina a quantidade de fibrinogênio funcional. Este é o método mais utilizado, estando disponível para determinação manual ou automatizada.

### **Método de Clauss**

Fundamento:

Em presença de um excesso de trombina, o tempo de coagulação de um plasma diluído de forma adequada é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio plasmático. O tempo de coagulação obtido é comparado posteriormente com uma preparação de fibrinogênio padronizada.

Material e método

- ▶ Plasma citratado pobre em plaquetas
- ▶ Tampão de Owren pH 7,35
- ▶ Calibrador para fibrinogênio
- ▶ Trombina
- ▶ Plasma diluído (calibrador ou paciente) . . . . . 200 µl

Incubar a 37°C por 2 minutos

Acionando o cronômetro, adicionar a trombina . . . . . 200 µl

Registrar e plotar os valores em segundos encontrados em papel di-log das diluições da amostra, do calibrador e do paciente.

As diluições da curva de calibração devem ser escolhidas de forma que o tempo de coagulação obtido fique compreendido entre 8 e 25 segundos. Este intervalo é freqüentemente obtido em diluição 1:10 do calibrador em tampão Owren pH 7,35, equivalente a uma concentração de fibrinogênio de 1,5 a 4 g/l.

Caso a concentração de fibrinogênio do paciente seja inferior ao tempo de 8 segundos ou superior a 25 segundos, deve-se repetir o teste utilizando diluições de 1:20 e 1:5, respectivamente, fazendo os ajustes em função dos fatores de concentração.

Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

### 9.3.8 Deficiência de fator II (protrombina)

A deficiência de fator II é transmitida de modo autossômico e recessivo, sendo a forma grave muito rara. A deficiência pode ser quantitativa, na qual concentração e atividade são comparáveis, tal como na hipoprotrombinemia ou qualitativa com concentração normal e atividade diminuída, tal como na disprotrombinemia.

O diagnóstico da deficiência é sugestivo a partir de um prolongamento do TP, discreto prolongamento do TTPA e TT normal. O diagnóstico é realizado com a determinação do TP e a dosagem imunológica da protrombina, que permite distinguir uma hipoprotrombinemia do quadro de uma disprotrombinemia.

#### Material e Método

- ▶ Plasma substrato deficiente em fator II
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Tampão Michaelis pH 7.35
- ▶ Plasma de referência
- ▶ Amostra problema: plasma citratado pobre em plaquetas

Antes da realização dos testes, caso as amostras, plasma de referência e plasma teste, estejam congelados, as mesmas devem ser descongeladas rapidamente a 37°C. Reconstituir o reativo de tromboplastina de acordo com as indicações do fabricante e pré-aquecê-lo a 37°C.

Curva de calibração: realizar diluições seriadas do plasma de referência, em tampão, partindo de uma diluição de 1/5 ou 1/10, equivalendo a 100%. É aconselhável que a curva de calibração possua no mínimo 6 pontos. Os tubos com as diluições para a curva de calibração e as do paciente a testar não devem permanecer além de 30 minutos a temperatura ambiente, sendo aconselhável manter em banho de gelo.

Colocar em tubo de vidro a 37°C.

Cada diluição . . . . . 100 µl  
Substrato deficiente de fator II . . . . . 100µl

Misturar e incubar por 1 minuto a 37°C e adicionar:

Tromboplastina cálcica pré aquecida a 37° C . . . . .200 µl

Medir o tempo para formação do coágulo. Realizar teste em duplicata.

#### Resultados

Plotar a porcentagem da diluição na abscissa em papel di-logaritmo, e o tempo em segundos na ordenada. Em coagulômetros automatizados, os volumes utilizados são diferentes, alguns aparelhos realizam diluições das amostras automaticamente e a padronização depende dos mesmos.

Valores de referência:

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.



# 10 PLAQUETOPATIAS

## 10.1 Introdução

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos, anucleados, derivados dos megacariócitos. Circulam na periferia do vaso na forma discóide com diâmetro que varia de 2 a 4  $\mu$  e com espessura de 0.9  $\mu$ . Quando ativadas emitem pseudópodes e mudam para a forma esférica. No sangue periférico, o número dessas células pode variar de 150.000 a 450.000/mm<sup>3</sup>.

No mecanismo hemostático, as plaquetas participam tanto da hemostasia primária (adesão, agregação e secreção) quanto da hemostasia secundária, fornecendo fosfolípidos de membrana para o ancoramento e ativação dos fatores de coagulação.

### Adesão plaquetária

Quando o vaso é lesado ocorre exposição dos componentes subendoteliais (colágeno, fibronectina e laminina). O FvW circulante facilita a adesão inicial se ligando ao complexo glicoprotéico plaquetário Ib/IX/V, em condições de alta força de cisalhamento. Essa interação favorece outras ligações ao colágeno subendotelial através dos receptores GPIa -IIa e GPVI que também promovem a ativação plaquetária.

### Agregação plaquetária

A resposta da ativação plaquetária inclui mudanças da forma (esferóide) com emissão de pseudópodes e exposição de fosfolípidos de carga negativa na superfície plaquetária, facilitando a interação com as proteínas da coagulação. Além disso, há a exposição do sítio ligante do complexo GP IIb-IIIa ao fibrinogênio e a interação plaqueta-fibrinogênio-plaqueta e plaqueta-FvW-plaqueta (em local de alta força de cisalhamento) resultando na agregação plaquetária.

## Secreção plaquetária

Durante o processo de ativação, o conteúdo dos grânulos alfa, densos e lisossomais plaquetários é secretado, amplificando o recrutamento e ativação de outras plaquetas circulantes para o local próximo a lesão. A partir dos grânulos alfa são liberados FvW, fatores de coagulação tais como fibrinogênio, fator V, fator XI, fator XIII, a proteína de adesão P-seletina, fator plaquetário 4,  $\beta$ -tromboglobulina, fatores de crescimento derivados de plaquetas, inibidor do plasminogênio, vitronectina e trombospondina. Dos grânulos densos são liberados ADP, ATP, íons cálcio e serotonina e dos lisossomos as glicosidases e proteases, enzimas críticas para a função plaquetária. Concomitantemente, é liberado o ácido araquidônico ligado à fosfatidilcolina da membrana plaquetária, por ação da fosfolipase A2. O ácido araquidônico livre é metabolizado pela enzima ciclo-oxigenase (COX) tendo como produto o eicosanóide tromboxano A2 (TXA<sub>2</sub>), potente agente agregante e quimiotático para outras plaquetas e leucócitos. Esse produto, assim como o conteúdo dos grânulos, é secretado para fora da plaqueta através do seu sistema canicular aberto.

## Outros processos bioquímicos envolvidos na agregação e secreção plaquetária

O ADP liberado, a trombina gerada no início da cascata da coagulação, colágeno e TXA<sub>2</sub> se ligam aos receptores transmembrana específicos das plaquetas circulantes. O sinal de ativação para o interior da célula (transdução de sinal) é transmitido pelas proteínas G (mensageiros primários) que ativam outras enzimas envolvidas na via metabólica, tal como a fosfolipase C e proteína C quinase, resultando na elevação citoplasmática de íons cálcio e fosforilação de proteínas. A ativação enzimática leva a mudanças no citoesqueleto favorecendo a emissão de pseudópodes, reação de liberação dos conteúdos intragranulares, ativação da fosfolipase A2 e produção do TXA<sub>2</sub>, exposição da membrana pró-coagulante e do complexo glicoprotéico IIb-IIIa.

Alterações na função plaquetária ou do número de plaquetas causam desequilíbrio nas fases iniciais do sistema hemostático, resultando em manifestações hemorrágicas ou trombóticas de variável gravidade na dependência do grau e tipo de alteração

Alterações plaquetárias quantitativas (plaquetopenias e plaquetoses)

### **Plaquetopenias**

As plaquetopenias são classificadas de acordo com o número de plaquetas circulantes, sendo leve, moderada e grave se contagem for acima de 50.000/mm<sup>3</sup>, entre 20.000 e 50.000/mm<sup>3</sup> e abaixo de 20.000/mm<sup>3</sup>, respectivamente.

As plaquetopenias podem ser de causa adquirida ou hereditária.

### **Plaquetopenias adquiridas**

Uma das principais causas de plaquetopenia adquirida é devida a condição conhecida como pseudoplaquetopenia, plaquetopenia laboratorial ou plaquetopenia factícia, que acomete até 2% dos pacientes hospitalizados. A diminuição do número de plaquetas é devido à presença de plaquetas aglutinadas, que formam grumos e não são, então, reconhecidas (contadas) pelos contadores eletrônicos. A confirmação pode ser realizada através de contagem das plaquetas em câmara de Neubauer ou esfregaço de sangue em lâmina. Esse fenômeno deve-se a modificação antigênica na superfície plaquetária ocasionada pelo anticoagulante EDTA. Na maioria das vezes, a coleta de sangue com citrato de sódio, ao invés do EDTA, evita a aglutinação plaquetária com a normalização na contagem. Outra reação imunológica, o satelitismo em que ocorre a adesão das plaquetas aos leucócitos, também cursa com contagem plaquetária bastante reduzida quando avaliada por contadores eletrônicos. Assim, mediante um resultado de contagem de plaquetas evidenciando plaquetopenia, deve-se sempre repetir a contagem através de coleta de sangue em EDTA com processamento rápido após a coleta, coleta de sangue em citrato e/ou contagem de plaquetas em câmara ou esfregaço de sangue periférico. Caso o novo resultado evidencie plaquetas normais, o diagnóstico sugestivo é de pseudoplaquetopenia. Mediante manutenção do número reduzido, deve-se investigar outras causas de plaquetopenia.

Outras causas de pseudoplaquetopenia são: a coagulação do sangue devido à coleta inadequada levando ao aumento do consumo de plaquetas, presença de crio aglutininas e presença de plaquetas gigantes que, em equipamentos eletrônicos, são confundidas com leucócitos.

As plaquetopenias adquiridas podem também estar presentes em doenças autoimunes, coagulação vascular disseminada, esplenomegalia, em doenças que levam a supressão da medula óssea por infecções (virais e bacterianas), drogas, infiltração medular (leucemia, linfoma, neoplasia metastática), em doenças que levam a redução de produção de plaquetas pela medula óssea (anemia aplástica), por efeito dilucional (como por exemplo, após transfusão de grande volume de concentrado de hemácias ou sangue total), dentre outras.

#### Plaquetopenias hereditárias

Embora raras, as plaquetopenias hereditárias são classificadas tendo-se como base o tamanho da plaqueta ou geneticamente, através da determinação da mutação genética que ocasionou sua redução. Além de apresentarem número reduzido, algumas plaquetopenias também apresentam função alterada.

Plaquetas pequenas: podem estar presentes na síndrome de Wiskott-Aldrich (pool de estoque diminuído) e trombocitopenia relacionada ao cromossomo X.

Plaquetas de tamanho normal: podem estar presentes na trombocitopenia amegacariocítica congênita e anemia aplástica de Fanconi.

Plaquetas gigantes: podem estar presentes na síndrome de Bernard Soulier, pseudoDvW, anomalias relacionadas ao gene MYH9 (May-Hegglin, síndromes de Sebastian, Fechtner e Epstein) e síndrome da plaqueta cinza (ausência de grânulo  $\alpha$ ).

#### Plaquetoses

A plaquetose é a presença de número aumentado de plaquetas no sangue periférico. Pode ser primária (também denominada de essencial e relacionada a doença mieloproliferativa) ou reativa que freqüentemente é assintomática, mas pode causar trombose em alguns pacientes.

## 10.2 Testes laboratoriais para a quantificação das plaquetas e caracterização de plaquetopenias hereditárias

- ▶ Contagem do número de plaquetas do sangue periférico
- ▶ Análise microscópica de esfregaço de sangue em lâmina corada com Leishman ou corantes especiais como May Grunwald, no caso de investigação de plaqueta cinza.
- ▶ Testes especiais (moleculares e bioquímicos)

Contagem de plaquetas

### Métodos manuais

- ▶ Câmara de Neubauer
- ▶ Método de Fônio

*Método de Fônio ou método indireto*

Princípio

As plaquetas são contadas em esfregaço de sangue em lâmina e posteriormente são relacionadas com o número de eritrócitos por  $\text{mm}^3$  de sangue. Além quantificar o número, o método de Fônio possibilita a avaliação da morfologia da plaqueta. Entretanto, este não é um método com boa exatidão.

Técnica

- ▶ Coletar o sangue com EDTA
- ▶ Fazer o esfregaço de sangue em lâmina e corá-la com o corante apropriado
- ▶ Contar as plaquetas existentes em, no mínimo 10 campos que contenham cerca de 200 eritrócitos por campo
- ▶ Contar o número absoluto de eritrócitos e relacionar com o número de plaquetas.

Interpretação

Alterações morfológicas das plaquetas

Plaquetas gigantes e macroplaquetas: a presença de macroplaquetas no sangue periférico sugere um turnover acelerado de plaquetas. Estão

presentes quando ocorre destruição periférica exagerada, como na púrpura trombocitopênica imunológica e trombozes extensas. Já as plaquetas gigantes são encontradas nas síndromes de Bernard Soulier, plaqueta cinza, anomalia de May-Hegglin, síndromes de Sebastian, Fechtner e Epstein.

Anisocitose plaquetária. plaquetas pequenas, normais e grandes sem predomínio de tamanho. É encontrada em situações nas quais existe aceleração do processo de produção de plaquetas, tal como nas síndromes mieloproliferativas e mielodisplásicas.

### **Método eletrônico**

Atualmente um grande número de equipamentos eletrônicos tem sido empregado na rotina de contagem plaquetária, sendo que a maioria deles utiliza o método de impedância elétrica ou sinal óptico. Os mais modernos, são baseados na detecção imunológica por citometria de fluxo como auxílio de fluorocromos conjugados com o monoclonal CD61.

Além da acurácia na contagem, os métodos eletrônicos permitem a avaliação de alguns parâmetros plaquetários, tal como o volume plaquetário médio (VPM) e a amplitude de distribuição das plaquetas (PDW) ou índice de anisocitose plaquetária.

O VPM tem sido utilizado para distinguir as plaquetopenias por redução da sobrevivência das plaquetas (VPM alto) das causadas por deficiência de produção medular (VPM baixo).

Apesar da sensibilidade dos equipamentos eletrônicos, os de leitura por impedância apresentam limitações quanto à discriminação de plaquetas de outras partículas de mesmo tamanho como é o caso de plaquetas gigantes. Além disso, estes equipamentos podem apresentar erros em contagens plaquetárias abaixo de 30.000/mm<sup>3</sup>.

### **Alterações plaquetárias qualitativas (plaquetopatias)**

As plaquetopatias podem ser de causa hereditária ou adquirida, sendo que as últimas são mais freqüentes.

## 10.3 Plaquetopatias hereditárias

As plaquetopatias hereditárias podem ser diagnosticadas de acordo com alterações de função:

- ▶ Defeitos primários na interação plaqueta-parede de vaso (doenças de adesão): estas são a DvW e síndrome de Bernard Soulier (diminuição ou ausência do complexo glicoprotéico plaquetário Ib/IX/V)
- ▶ Defeitos primários na interação plaqueta-plaqueta (doença de agregação): estas são a afibrinogenemia (ausência de fibrinogênio plasmático) e trombastenia de Glanzmann (alteração do complexo glicoprotéico plaquetário IIb-IIIa)

Defeitos de estoque dos grânulos, secreção e transdução de sinal:

### Doença de pool de estoque

- ▶ grânulo  $\alpha$ , densos ou ambos
- ▶ doença de Quebec (estoque aberrante de ativador do plasminogênio tipo uroquinase degradando o conteúdo dos grânulos  $\alpha$ )

### Doença de secreção plaquetária e transdução de sinal

- ▶ defeitos de interação plaqueta – agonista devido a anormalidades nos receptores de  $TXA_2$ , ADP e colágeno
- ▶ alteração da metabolização do ácido araquidônico e síntese de  $TXA_2$ , devido à diminuição da liberação do ácido araquidônico, deficiência das enzimas cicloxigenase ou tromboxano sintetase
- ▶ defeito na ativação das proteínas G (mensageiras primárias)
- ▶ defeito no metabolismo do fosfatidilinositol ligado à membrana celular
- ▶ defeito na mobilização de cálcio intra citoplasmático
- ▶ deficiência da proteína C quinase

### Doença de função procoagulante

- ▶ defeito na membrana fosfolipídica – síndrome de Scott
- ▶ fator V plaquetário anormal (fator V New York)

## Defeitos na estrutura e componentes do citoesqueleto plaquetário

- ▶ doenças relacionadas com o gene MYH9
- ▶ síndrome de Wiskott-Aldrich
- ▶ esferocitose plaquetária

A prevalência das doenças plaquetárias hereditárias na população geral não está bem estabelecida. Contudo, em indivíduos com diátese hemorrágica (por exemplo menorragia), a DvW, alteração de secreção e sinalização plaquetária são mais comuns que as deficiências de grânulos, defeitos na produção de TXA<sub>2</sub> e outras.

## 10.4 Plaquetopatias adquiridas

Ao contrário das plaquetopatias hereditárias, que são raras, as doenças de função plaquetária adquiridas são comumente encontradas na prática hematológica. Algumas doenças sistêmicas e várias drogas podem estar envolvidas. Entre as doenças destacam-se mieloma múltiplo, insuficiência renal, doenças mieloproliferativas, cirrose hepática, lúpus eritematoso sistêmico e situações como a circulação extra-corpórea. Quanto às drogas cita-se os anti-inflamatórios não esteroidais como o ácido acetil salicílico (AAS), ibuprofeno, acetaminofeno, anti-inflamatórios esteroidais, clopidogrel, ticlopidina, antibióticos em altas doses, anestésicos, tranquilizantes fenotiazínicos e outros.

Os principais mecanismos associados à disfunção plaquetária induzida por medicamentos são a inibição da síntese das prostaglandinas, aumento dos níveis de AMP cíclico (cAMP) plaquetário, e interferência com a função receptora da membrana plaquetária. Porém, a disfunção plaquetária secundária a doenças sistêmicas está mais relacionada à presença de proteínas plasmáticas anormais (por exemplo, paraproteínas do mieloma), proteínas como produtos de degradação da fibrina (PDFs) e diminuição do conteúdo intragranular.

## 10.5 Testes laboratoriais

Os testes laboratoriais, além de auxiliar no diagnóstico da disfunção plaquetária, são empregados para monitoração de drogas antiplaquetárias, de terapia pró-hemostáticas, prevenção de trombose ou sangramento e no controle de qualidade de plaquetas estocadas para transfusão.

Testes iniciais ou de triagem

- ▶ Contagem de plaquetas
- ▶ TS

Testes específicos

- ▶ Agregação plaquetária por sistema óptico
- ▶ Agregação plaquetária por impedância

Testes especiais

- ▶ Avaliação da secreção do conteúdo intragranular ( $\alpha$  e densos)
  - Determinação plasmática de fator plaquetário 4
  - Determinação plasmática de  $\beta$ -tromboglobulina
  - Captação de serotonina plaquetária
  - Luminescência (liberação de ATP)
- ▶ Citometria de fluxo para detecção das glicoproteínas de membrana plaquetária
- ▶ Microscopia eletrônica
- ▶ Estudos moleculares
- ▶ Estudos de fosforilação de proteína, expressão de receptor e outros

Até os anos 80 eram utilizados, na prática clínica, apenas os testes tradicionais de função plaquetária como, TS, agregação plaquetária por sistemas óptico e impedância, além de alguns testes bioquímicos. Desde o último manual do Comitê Britânico de Padronização em Hematologia (BCSH) de 1988, uma variedade de novos testes de função plaquetária foram desenvolvidos que incluíram a citometria de fluxo e outros equipamentos.

## Novos equipamentos

Os novos equipamentos utilizam pequenos volumes de sangue total, são rápidos, permitem a avaliação da função plaquetária à beira do leito do paciente e alguns deles simulam a alta força de cisalhamento in vitro. Com exceção dos analisadores de função plaquetária, a maioria dos equipamentos não está completamente validada. São equipamentos disponíveis:

- ▶ Analisador de função plaquetária (ex, PFA-100®)
- ▶ VerifyNow – utilizado exclusivamente para monitoração de antiagregantes
- ▶ Impact R – avalia a adesão e agregação sob alta força de cisalhamento
- ▶ Tromboelastógrafos – avaliam a função plaquetária interrelacionada à coagulação
- ▶ Plateletworks®

Deve-se enfatizar que ainda faltam estudos de evidência científica comprovando a eficácia da utilização destes equipamentos.

### 10.5.1 Testes de triagem

Contagem de plaquetas: vide sessão 10.2

TS – Ivy

O princípio e técnica do TS foram discutidos no capítulo 9.1.4.1.1.

Interpretação

O TS está prolongado na:

- ▶ plaquetopenia (com plaquetas abaixo de 100.000/mm<sup>3</sup>)
- ▶ síndrome de Bernard Soulier
- ▶ trombastenia de Glanzmann
- ▶ DvW (alguns tipos e subtipos)
- ▶ plaquetopatias adquiridas: uremias, mielomas, hipo ou disfibrinogenemias, drogas.

O teste apresenta várias desvantagens, motivo pelo qual está sendo descontinuado na prática clínica como teste de triagem das plaquetopatias. É

invasivo, pode formar cicatriz e quelóide, é pouco reprodutível, é dependente do operador, apresenta baixa sensibilidade à disfunção leve e pouca correlação com a tendência a sangramento.

O TS é influenciado por vários fatores como, idade, sexo, temperatura, elasticidade da pele, hematócrito, local e a direção da incisão. Há vários anos o TS vem sendo substituído pelos analisadores de função plaquetária.

#### Analisador de função plaquetária

##### Princípio

O sangue total é aspirado por um sistema fechado a vácuo através de um capilar de 147 µm de abertura. Esse sistema simula a alta força de cisalhamento alterando a estrutura do FvW. Para o funcionamento, o equipamento requer cartuchos contendo colágeno e ADP (CADP) ou colágeno e epinefrina (CEPI).

As plaquetas interagem com o FvW modificado e aderem espontaneamente ao colágeno presente na membrana e agregam por estímulo de ADP ou adrenalina. O equipamento mede o tempo de oclusão, tempo esse requerido para o agregado plaquetário obstruir a abertura e cessar o fluxo de sangue.

##### Interpretação

O tempo de oclusão (TO) é prolongado, na maioria dos pacientes com disfunção plaquetária hereditária ou adquirida. Defeitos nos receptores de membrana das plaquetas como GPIIb-IIIa (trombastenia de Glanzmann) e GPIb (síndrome de Bernard Soulier) estão associados a um prolongamento do TO tanto no CADP quanto no CEPI.

Na DvW, o analisador de função plaquetária tem grande sensibilidade em detectar particularmente os tipos 2 e 3. Porém, nas doenças hemorrágicas leves e moderadas tais como doença de estoque e defeitos de secreção, a sensibilidade diminui consideravelmente.

Outra indicação de uso do equipamento é para monitoração de drogas antiagregantes como ácido acetil salicílico.

## 10.5.2 Testes específicos

### **Agregação plaquetária por sistema óptico**

O teste de agregação plaquetária por sistema óptico ou turbidimétrico é considerado o método padrão ouro para a avaliação da função plaquetária. Utiliza um equipamento capaz de detectar a transmissão luminosa através do plasma rico em plaquetas em suspensão. À medida que as plaquetas se agregam por adição de um agente agregante ocorre diminuição da turbidez e um aumento proporcional da transmissão de luz que é captada por um registrador acoplado ao equipamento.

A agregação plaquetária por sistema óptico revela as diferentes fases da cinética de agregação quando o agonista é adicionado ao plasma rico em plaquetas.

### **Agregação plaquetária por sistema de impedância**

O método de impedância elétrica permite a avaliação da função plaquetária em condições fisiológicas, quando realizada em sangue total. Baseia-se na quantificação do aumento progressivo da impedância elétrica entre dois eletrodos introduzidos no tubo contendo sangue total ou plasma rico em plaquetas. Na medida em que as plaquetas se aderem aos eletrodos por adição do agente agregante, estas ativam e recrutam outras células para o local (outras plaquetas, leucócitos e eritrócitos) aumentando da resistência elétrica. Diferente do sistema óptico, na agregação plaquetária por impedância não há distinção de primeira e segunda onda.

Protocolo de coleta, processamento e execução de agregação plaquetária por método óptico

As variáveis pré-analíticas e analíticas determinam a confiabilidade dos resultados. A manipulação inadequada das plaquetas leva uma maior ativação *in vitro* com a perda do conteúdo intragranular com muita facilidade. A qualidade, o armazenamento e as concentrações dos agentes agregantes são muito importantes para o diagnóstico das doenças plaquetárias.

## Coleta

### Punção e agulhas

Para a coleta de sangue é importante que o flebotomista tenha muita experiência, pois o excesso de manipulação da agulha danifica o tecido ocasionando uma maior exposição do subendotélio, liberação de fator tecidual e ativação plaquetária.

É recomendável o uso de agulhas de calibre 21 para os adultos, por promoverem menor lesão tecidual e hemólise. Para crianças recomenda-se o de número 23 devido ao calibre da veia.

No caso de veia de difícil acesso, deve ser adotada a técnica de duas seringas para facilitar o descarte dos três primeiros mililitros de sangue. Alternativamente, se o sangue for colhido em tubo a vácuo, o primeiro tubo deve ser descartado.

### Tubos

Os tubos de coleta devem ser de plástico ou de vidro revestido com silicone para evitar a adesão e ativação das plaquetas promovida pela carga negativa da superfície do vidro.

Após a realização de vários testes foi demonstrado que o uso de tubos a vácuo não ativa as plaquetas, portanto podem ser utilizados.

### Anticoagulante

O citrato de sódio 3.2% na proporção de 1 volume de anticoagulante para 9 volumes de sangue deve ser o anticoagulante utilizado para a coleta dos testes de agregação plaquetária. Nos casos em que o hematócrito estiver acima de 55%, faz-se necessário a correção do volume de anticoagulante tal como descrito no capítulo 6.1.1.1.

Após a coleta, mesmo em tubos a vácuo, deve-se homogeneizar as amostras delicadamente, sem a formação de espuma, de 4 a 5 vezes para evitar a ativação da coagulação e hemólise.

Além do hematócrito anormal, vários medicamentos podem interferir na função plaquetária, principalmente as drogas contendo ácido acetil salicílico, antiinflamatórios não esteroidais, corticóides, antihistamínicos, antibióticos,

antidepressivos e outros. Nos casos em que o paciente não fizer uso contínuo, principalmente de medicamentos contendo ácido acetil salicílico, a droga deve ser suspensa nos 10 dias que antecedem a coleta. Caso contrário, o laboratório deve ser informado para melhor interpretação dos resultados.

#### Envio e processamento da amostra

Após a coleta, o material deve ser identificado e enviado imediatamente ao laboratório à temperatura ambiente. Se for colhido em local distante ao laboratório, com necessidade de transporte motorizado, deve ser envolvido em "plástico bolha" e enviado à temperatura ambiente com o mínimo de agitação. A agitação do sangue leva a ativação das plaquetas com perda do conteúdo intra-granular e conseqüentemente uma resposta com resultado hipoagregante. O tempo entre a coleta da amostra e a realização do teste não deve exceder 3 a 4 horas.

#### Preparação do plasma rico em plaquetas

Após a coleta, o sangue é centrifugado a 200 x g por 10 a 15 minutos à temperatura ambiente (sem a opção brake da centrífuga para evitar a ressuspensão das plaquetas) para a obtenção do PRP. Nota importante: os tubos devem ser centrifugados com tampa para a manutenção do pH entre 7.7 – 8.0.

O PRP é removido cuidadosamente com auxílio de pipeta plástica e colocado em tubo de polipropileno ou tubo siliconizado para evitar a ativação das plaquetas. Deve-se evitar também a formação de espuma e contaminação com eritrócitos e leucócitos, uma vez que a contaminação com eritrócitos pode levar a valores falsamente baixos.

Uma pequena alíquota deve ser retirada para a contagem das plaquetas do PRP, devendo o tubo ser tampado novamente.

O PRP com número de plaquetas inferior a 150.000/ mm<sup>3</sup> pode apresentar resposta diminuída. A concentração de plaquetas por centrifugação não é recomendável por induzir a ativação. Nesses casos, deve-se reajustar o número de plaquetas do controle normal para o mesmo da amostra teste e comparar o padrão de resposta.

O reajuste do número de plaquetas do PRP com o PPP autólogo é aceito por alguns centros e rejeitado por outros. De acordo com alguns autores, a resposta de agregação sofre pouca influência quando o número de plaquetas do PRP varia entre 200.000/mm<sup>3</sup> a 600.000/mm<sup>3</sup>. Porém, acima desses valores aconselha-se o reajuste para 300.000/mm<sup>3</sup>. Cattaneo e colaboradores mostraram que durante a centrifugação da amostra em alta velocidade, para a obtenção do PPP, ocorre a ativação das plaquetas decorrente da liberação de ADP por eritrócitos e pelas próprias plaquetas, portanto em nenhuma hipótese deve-se reajustar o número de plaquetas com o PPP autólogo.

Reajuste do número de plaquetas do plasma rico em plaquetas com o plasma pobre em plaquetas

Após a obtenção do PPP do paciente, o reajuste do número de plaquetas deve ser calculado através de regra de três.

Exemplo:

PRP = 800.000 plaquetas/mm<sup>3</sup> para chegar a 300.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>

$$800.000 \div 300.000 = 2.6$$

Portanto, o PRP deverá ser diluído 2.6 vezes

1 volume de PRP + 1.6 volumes de PPP

Se o volume obtido do PRP for 4 ml

1 ml de PRP ----- 1.6 ml de PPP

4 ml de PRP ----- X ml de PPP

$$X = 6.4 \text{ ml}$$

Portanto, a adição de 6.4 ml de PPP a 4 ml de PRP reajustará o número de plaquetas para 300.000/mm<sup>3</sup>

Tempo

A resposta plaquetária aos agonistas se altera com o tempo. Logo após a preparação do PRP, as plaquetas são hiporresponsivas, provavelmente devido a dessensibilização dos receptores de ADP, que é liberado por plaquetas e eritrócitos durante a centrifugação do sangue total. A verdadeira resposta se inicia após 15 minutos, aumenta aos 30 minutos e permanece estável até a terceira hora após o preparo do PRP. Após esse tempo, a resposta diminui

novamente em consequência da exaustão da reserva de energia da plaqueta. Portanto, a agregação plaquetária por sistema óptico deve ser realizada entre 15 a 30 minutos após a preparação do PRP e finalizada dentro de 2 a 3 horas.

#### Agentes agregantes plaquetários

O teste de agregação plaquetária, tanto por sistema óptico como por impedância, emprega vários agentes agonistas para o diagnóstico de plaquetopatias e para o controle de drogas antiagregantes.

Os agentes mais empregados são. ADP (adenosina 5' difosfato), epinefrina ou adrenalina (ADR), colágeno, ácido araquidônico (AA), ristocetina e plasma bovino ou crioprecipitado.

Embora as concentrações finais dos agonistas adicionadas às plaquetas sejam de extrema importância no esclarecimento da alteração da plaqueta, até hoje não existe nenhuma padronização internacional referente às doses que devem ser empregadas rotineiramente.

Quanto à escolha dos agonistas, deve ser dependente da suspeita clínica. Um exemplo é a investigação laboratorial de trombostenia de Glanzmann que apresenta diminuição ou ausência do complexo glicoproteico IIb-IIIa plaquetário. Para seu diagnóstico, os agonistas empregados são ADP, ADR, AA e colágeno cuja agregação é dependente do complexo GPIIb-IIIa. O teste de agregação com ristocetina não é indicado neste caso, pois o seu mecanismo de ação é modificar a estrutura do FvW para melhor interagir com a glicoproteína Ib (GPIb) da plaqueta. Esse agonista é utilizado nos diagnósticos laboratoriais de síndrome de Bernard Soulier (deficiência ou ausência do complexo GPIb-IX-V), DvW e pseudoDvW.

#### Concentrações dos reagentes

As soluções estoque devem ser mantidas conforme instruções do fabricante.

**ADP** - as concentrações da solução estoque são variáveis. São dependentes da marca do reagente e equipamento utilizado. Vários laboratórios utilizam, para uma maior estabilidade, a solução estoque de ADP na concentração de 3 mM. A solução deve ser mantida a - 20°C e descongelada na hora do uso para posterior diluição com solução fisiológica 0,9%.

Concentrações finais de 1  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ , em indivíduos normais, promovem duas ondas distintas de agregação. A primeira onda representa a interação do ADP com os seus receptores específicos ( $\text{P}_2\text{Y}_{12}$  e  $\text{P}_2\text{Y}_1$ ) e a presença das glicoproteínas IIb-IIIa; a segunda onda se refere a resposta de liberação endógena de ADP e metabolização do ácido araquidônico em  $\text{TXA}_2$ , potente agente agregante.

Concentrações finais abaixo de 1  $\mu\text{M}$  induzem a primeira onda de agregação e segunda onda reversível (desagregação).

Concentrações finais entre 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ , em indivíduos normais, promovem a fusão da fase primária e secundária.

Concentrações finais de ADP recomendadas: 10  $\mu\text{M}$  (dose alta); 0,7  $\mu\text{M}$  (dose baixa)

É importante a utilização de pequenos volumes do agonista (até 20  $\mu\text{l}$ ) para não ocorrer diluição do PRP durante a reação de agregação plaquetária.

Adrenalina ou epinefrina - as doses de adrenalina empregadas na agregação plaquetária variam de 5  $\mu\text{M}$  a 10  $\mu\text{M}$ .

A adrenalina interage com os receptores  $\alpha$ -adenérgicos e, assim como o ADP, é dependente do complexo GPIIb-IIIa.

A curva de agregação clássica com adrenalina consiste de uma primeira onda curta seguida de uma grande resposta secundária.

Concentrações finais de adrenalina recomendadas: 5  $\mu\text{M}$  (dose alta); 1  $\mu\text{M}$  (dose baixa)

**Colágeno** - a suspensão mais estável é derivada de tendão de equino (1 mg/ml) e deve ser estocado a 4°C.

As concentrações finais de uso variam entre 1  $\mu\text{g/ml}$  a 5  $\mu\text{g/ml}$ . O colágeno na concentração final de 1  $\mu\text{g/ml}$  é utilizado na monitoração de inibição da cicloxigenase promovida pelo ácido acetil salicílico, como antiagregante. Já a concentração de 5  $\mu\text{g/ml}$  avalia a via da fosfolipase C plaquetária.

A resposta plaquetária in vitro ao colágeno é definida inicialmente por interação com os receptores plaquetários (GPIa/IIa; GPVI) que promove

um aumento de densidade óptica devido à mudança de forma seguida a uma fase de latência, onde as plaquetas se aderem às fibras do colágeno e posteriormente com intensa agregação.

Concentrações finais de colágeno recomendadas: 5 µg/ml (dose alta); 1 µg/ml (dose baixa)

**Ácido araquidônico (AA)** - o reagente deve estar na forma de sal sódico para melhor solubilidade e a diluição deve ser com carbonato de sódio 0.1 M.

A solução estoque (50 mM) deve ser protegida da luz, não ter contato com oxigênio para prevenção de oxidação e mantida a -20°C.

Quando as plaquetas são estimuladas com o agonista AA em concentrações finais de 0.5 mM a 1 mM é avaliada a via enzimática da cicloxigenase. Ocorre uma rápida metabolização deste composto pela cicloxigenase a endoperóxidos cíclicos e TXA<sub>2</sub>, com formação de uma única onda de agregação. Além de ser empregado para o diagnóstico laboratorial de deficiência hereditária da cicloxigenase e trombastenia de Glanzmann (deficiência ou ausência do complexo GPIIb-IIIa), é utilizado no controle terapêutico do antiagregante plaquetário, ácido acetil salicílico (AAS) na concentração final de 1 mM.

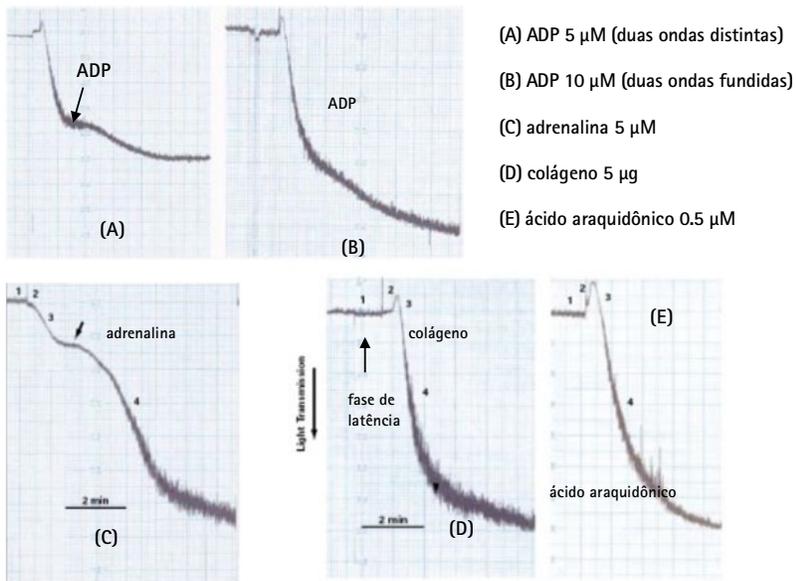
Concentrações finais de ácido araquidônico recomendadas: 0.5 mM (dose alta); 0.06 mM (dose baixa)

**Ristocetina** – é um antibiótico que atua como cofator da ligação FvW plasmático – GIIb plaquetário.

Para investigação da DvW, as concentrações finais de ristocetina devem ser: 0.6 mg/ml e 1.2 mg/ml. A ristocetina é também utilizada na investigação da síndrome de Bernard Soulier. Devido a deficiência ou ausência do complexo GPIIb/IX plaquetário, a resposta à ristocetina é diminuída na concentração final de 1.2 mg/ml. Para a diferenciação laboratorial de DvW e síndrome de Bernard Soulier é adicionado um volume de 15 µl de plasma bovino ou crioprecipitado (ricos em FvW) a 400 µl de PRP. Se houver agregação plaquetária, significa que no plasma teste havia deficiência de FvW, presente no plasma bovino. Caso contrário, se caracteriza que a ausência ou deficiência é da GPIIb/IX para interagir com o FvW.

Agregação espontânea: deve ser realizada para todos os pacientes. O mesmo volume de PRP, que é utilizado para os agonistas plaquetários, é colocado no agregômetro sem nenhum estímulo. Se positiva (> 15%), revela hiperagregação plaquetária mesmo se com os outros agentes agonistas a resposta for diminuída. Nesse caso indica que as plaquetas estavam sensibilizadas por contato prévio na circulação com os agonistas. A Figura 5 mostra as curvas características de agregação plaquetária com os agentes agonistas ADP, adrenalina, colágeno e ácido araquidônico.

**Figura 5** – Curvas de agregação plaquetária por sistema óptico com os agonistas ADP, adrenalina, colágeno e ácido araquidônico



Fonte: Zhou L. e Col., 2005

#### Técnica de agregação plaquetária por sistema óptico

O volume de PRP e dos agentes agregantes são variáveis e dependem do equipamento utilizado. Porém, a concentração final dos reagentes deve ser padronizada.

Interferências e limitações: O teste sofre interferência da presença de lípidos, quanto às limitações, o sistema óptico perde a sensibilidade se o número de plaquetas for inferior a 100.000/mm<sup>3</sup>.

Resultados: Os resultados de agregação plaquetária por sistema óptico podem ser expressos em amplitude de agregação (%), com estabelecimento prévio da variação normal de amplitude para cada agente e concentração ou qualitativos (normoagregante, hipoagregante, ausência de agregação ou hiperagregante).

Interpretação: Devido ao grande número de fatores interferentes, os resultados de agregação plaquetária requerem certa cautela quanto à interpretação. Os medicamentos que contêm aspirina não devem ser ingeridos durante 10 dias que antecedem a prova, a não ser que seu efeito sobre as plaquetas esteja sendo investigado. Além da aspirina outras substâncias podem interferir na função plaquetária como outros anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais, antihistamínicos, antibióticos, antidepressivos, diuréticos, vasodilatadores, beta-bloqueadores e bloqueadores de canal de cálcio. Alguns componentes que fazem parte da "dieta normal" quando ingeridos em excesso como álcool, cebola, alho, gengibre podem diminuir a agregação plaquetária. O quadro 13 lista várias drogas, alimentos e complementos que interferem na função plaquetária.

**Quadro 13** – Drogas, alimentos e complementos que interferem na função plaquetária

Agente	Mecanismo de ação
Abciximab (ReoPro)	Inibição GPIIb-IIIa
Ticlopidina, clopidogrel	Inibição receptores de ADP
Epoprostenol	Ativação da adenil ciclase
Anti-inflamatórios não esteroidais (AAS)	Inibição da geração de TXA <sub>2</sub>
Bloqueadores de canais de cálcio	Inibição dos canais de cálcio
Antidepressivos tricíclicos, fluoxetina	Inibição da captação de serotonina
Estatinas	Interferência na via de sinalização
Fenotiazínicos	Diminuição da agregação
Óleos de peixe	Redução da geração de TXA <sub>2</sub>
Vitamina E, cebola	Inibição do metabolismo do AA

Fonte: World Federation of Hemophilia. Disponível em: <www.wfh.org>. Acesso em: 2008.

#### Avaliação qualitativa de Agregação Plaquetária pelo sistema ótico

Avaliando-se qualitativamente os resultados de agregação plaquetária, quando empregados os agentes agonistas ADP, adrenalina e ácido araquidônico considera-se resposta normal quando as plaquetas apresentam a primeira (resposta primária) e segunda (resposta secundária) onda de agregação com as doses mais altas e apenas a primeira onda nas doses mais baixas do agonista. Quanto a resposta ao colágeno, deve-se valorizar a fase de latência e a presença da segunda onda nas doses finais de 1 µg/ml a 5 µg/ml.

#### Avaliação quantitativa da agregação plaquetária por sistema óptico

A avaliação por amplitude de agregação deve estabelecer previamente os valores normais para cada agente e as suas respectivas doses. Se a amplitude de agregação plaquetária do paciente estiver dentro dos valores estabelecidos, é considerada normal. É importante observar o perfil das curvas de agregação, sendo possível que a amplitude de agregação esteja dentro dos valores de referência, mas com a ausência da segunda onda de agregação.

A resposta hipoagregante, tanto para o ADP, adrenalina, ácido araquidônico e colágeno é resultado da ausência da segunda onda de agregação plaquetária com altas doses do agonista. Em relação à amplitude de agregação, os resultados estão abaixo do valor normal estabelecido pelo laboratório.

A ausência da segunda onda de agregação pode ser devido a vários fatores como deficiência de grânulos ou de seu conteúdo, deficiências de cicloxigenase, tromboxano sintetase, conteúdo granular, outras alterações relacionadas com o metabolismo plaquetário e drogas, sendo este o mais freqüente.

Alguns estudos mostram que cerca de 16% da população normal apresenta hipo ou ausência de agregação plaquetária com adrenalina.

A ausência de agregação plaquetária pode ser decorrente à deficiência ou ausência de receptores específicos como P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> e P<sub>2</sub>Y<sub>1</sub> (alteração dos receptores de ADP), GPIa-IIa e GPIV (receptores de colágeno), GPIIb-IIIa (receptor de fibrinogênio de FvW – Trombastenia de Glanzmann), deficiência das proteínas G e transdução de sinal.

A agregação plaquetária com ristocetina é diminuída na DvW (tipos 2A, 2M e 3) e também na síndrome de Bernard Soulier. Já na DvW do tipo 2B (FvW apresenta grande afinidade pelo receptor GPIb) e pseudoDvW (plaquetas com grande afinidade pelo FvW) as baixas doses de ristocetina (0.6 mg/ml) promovem intensa agregação plaquetária.

A agregação plaquetária com plasma bovino é normal na DvW e ausente na síndrome de Bernard Soulier.

A resposta hiperagregante é detectada quando se utiliza baixas doses do agente agonista. Enquanto que as plaquetas normais apresentam apenas uma pequena onda primária de agregação, as plaquetas hiperagregantes secretam normalmente.

#### Agregação plaquetária por sistema de impedância

A agregação por sistema de impedância não requer processamento do sangue total, portanto as plaquetas não são ativadas. Em casos de hematócrito normal, o sangue total é diluído 50% com solução fisiológica. Se o hematócrito estiver abaixo de 25% recomenda-se utilizar a amostra sem diluição. Esse método favorece a investigação da agregação em crianças devido ao pequeno volume de sangue utilizado, bem como a interação das plaquetas com eritrócitos e leucócitos. Diferentemente ao sistema óptico apresenta apenas uma onda de agregação plaquetária.

#### Concentração dos reagentes

**ADP** – a agregação em sangue total requer concentrações finais de 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M. Além de auxiliar no diagnóstico de plaquetopatias hereditárias, é o agonista de escolha para monitoração terapêutica das tienopiridinas (clopidogrel e ticlopidina).

**Adrenalina** – não é utilizada em sangue total por ser um agonista muito fraco.

**Ácido araquidônico** – da mesma forma que no sistema óptico, é utilizado no controle terapêutico do AAS, na concentração final de 0.5  $\mu$ M.

**Colágeno** – quando utilizado em baixas concentrações (1 a 2 µg/ml), é inibido por AAS e em concentrações mais altas (5 µg/ml), a agregação plaquetária com colágeno não é afetada.

**Trombina** – apesar de ser um agente agonista forte, é mais utilizado na investigação de secreção plaquetária. Na rotina laboratorial de agregação plaquetária é pouco utilizada por induzir a formação de fibrina.

**Ristocetina** – na concentração final de 1.0 mg/ml, indivíduos normais apresentam impedância elétrica maior que 5 ohms e tempo de latência < que 70 segundos. Já os pacientes com DvW tipo 2B, apresentam impedância elétrica maior que 20 ohms, em baixas concentrações (0.5 e 0.25 mg/ml) de ristocetina.

Interferências e limitações. A agregação em sangue total por impedância sofre interferências de drogas que atuam no metabolismo plaquetário, hematócrito baixo e é limitada em amostras contendo plaquetas abaixo de 50.000/mm<sup>3</sup>

Resultados: a amplitude de agregação é expressa em Ohms

#### Interpretação

Cada laboratório deve estabelecer os seus valores de referência para cada um dos agentes agregantes em diferentes concentrações.

#### Considerações finais sobre agregação plaquetária

- ▶ O tempo entre a coleta e execução do teste deve ser de no mínimo 15 minutos (tempo suficiente degradação de prostaciclina liberada na coleta de sangue) e no máximo 3 horas (acima desse tempo, o citrato de sódio retira cálcio intracelular)
- ▶ O tempo de reação deve ser no mínimo de 5 minutos
- ▶ Os reagentes devem ser mantidos em banho de gelo durante a reação
- ▶ Tanto o PRP quanto o sangue total devem ser mantidos à temperatura ambiente
- ▶ O PRP deve ser adicionado no tubo de reação imediatamente antes da reação

- ▶ A resposta de agregação plaquetária alterada deve ser repetida outras vezes para a confirmação do diagnóstico
- ▶ A agregação plaquetária do paciente deve ser sempre comparada ao pool de PRP de indivíduos normais sem uso de medicamentos
- ▶ O diagnóstico laboratorial das alterações de função plaquetária é dependente das variáveis pré-analíticas e analíticas
- ▶ O perfil de curva de agregação plaquetária por sistema óptico deve ser sempre considerado.
- ▶ Até hoje não há CQE de agregação plaquetária com o uso de plaquetas frescas no teste. Para tal, deve-se utilizar, como controle, em paralelo ao teste do paciente, um pool de PRP de indivíduos normais (n=10), obtido nas mesmas condições.

### 10.5.3 Testes especiais

Esses testes são complementares para o diagnóstico, porém são realizados apenas em centros especializados.

#### Avaliação de secreção plaquetária

Para dar continuidade à investigação das plaquetopatias, principalmente em pacientes que apresentam sangramento e ausência de segunda onda de agregação, a avaliação da secreção plaquetária torna-se necessária para o diagnóstico.

Pode-se avaliar a secreção dos grânulos  $\alpha$  através da determinação plasmática do fator plaquetário 4 (PF4) e  $\beta$  tromboglobulina ( $\beta$ TG) por kits comerciais de reação por Elisa. Outro marcador, que é amplamente utilizado é a P-seletina, que pode ser determinada no plasma como P-seletina solúvel ou ligada à membrana plaquetária por citometria de fluxo.

Para avaliação da secreção dos grânulos densos podem ser utilizados dois marcadores distintos, a serotonina e o ATP.

A serotonina é um agonista plaquetário natural e é rapidamente seqüestrada pelos grânulos densos. O método se baseia na incubação das plaquetas em sangue total ou em PRP durante 30 minutos com serotonina marcada com carbono<sup>14</sup>. Posteriormente, as plaquetas são ativadas e radioatividade é medida na secreção.

Por utilizar material radioativo, essa metodologia, embora bastante sensível, tem sido evitada.

O método alternativo de avaliação de secreção de grânulo denso é a liberação do nucleotídeo ATP em paralelo à agregação plaquetária. O método emprega o agregômetro de luminescência e o sistema enzimático, luciferina/luciferase, podendo ser realizado tanto em PRP como em sangue total.

O ATP liberado dos grânulos densos, em resposta a um agonista, reage com luciferina na presença da enzima luciferase emitindo luz que é rapidamente captada. A resposta é comparada a um padrão de ATP de concentração conhecida.

Os agonistas utilizados para a avaliação de secreção de ATP são: o ADP (5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M), colágeno (2  $\mu$ g/ml e 5  $\mu$ g/ml) e trombina (1 U/ml). A ausência ou diminuição da secreção de ATP de plaquetas estimuladas principalmente com trombina indica doença de estoque de grânulos densos. Em casos em que a liberação de ATP é normal somente em concentrações muito altas do agente agregante, sugere defeito de liberação.

#### Citometria de fluxo

A citometria de fluxo tem sido amplamente utilizada tanto na confirmação de plaquetopatias hereditárias quanto na avaliação de função plaquetária em diferentes condições clínicas.

Para a investigação são utilizados anticorpos monoclonais marcados com fluorescência direcionados a antígenos glicoprotéicos de membrana plaquetária ou a proteínas que são liberadas durante a ativação, tais como P-seletina (grânulo  $\alpha$ ) e granulofisina (grânulos lisossomais). Além de anticorpos, outras substâncias fluorescentes, como a mepacrina, podem ser utilizadas para a avaliação do conteúdo dos grânulos densos.

#### Anticorpos monoclonais utilizados

GIIb- IIIa: CD41a para investigação de trombostenia de Glanzmann

GPIb: CD42b para investigação de síndrome de Bernard Soulier

P-seletina: CD 62P para investigação da doença de estoque de grânulo  $\alpha$  e avaliação de ativação plaquetária

Granulofisina: CD63 (ausente na síndrome de Hermansky-Pudlak e aumentada na ativação plaquetária)

Anexina V: para avaliação da atividade pró-coagulante das plaquetas e pesquisa de síndrome de Scott

Avaliação do conteúdo dos grânulos densos: mepacrina

Microscopia eletrônica

A metodologia é bastante sofisticada e somente disponível em centros altamente especializados. É útil no diagnóstico de investigação de secreção plaquetária, revelando a presença ou ausência de grânulos e o seu conteúdo.

Conclusões

- ▶ O diagnóstico laboratorial das alterações de função plaquetária é dependente das variáveis pré-analíticas e analíticas
- ▶ Os testes de agregação plaquetária não estão padronizados, principalmente no que refere às doses dos agonistas
- ▶ O perfil de curva de agregação plaquetária por sistema óptico deve ser sempre considerado
- ▶ As disfunções plaquetárias encontradas por agregação plaquetária devem ser sempre repetidas para a confirmação do diagnóstico

# 11 REFERÊNCIAS

- ADCOCK, D. M. et al. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, Pa., v. 107, n. 1, p. 105-110, 1997.
- ANDREAE, M. C. et al. Congenital factor XIII deficiency: a patient report and review of the literature. **Clin. Pediatr.**, Philadelphia, Pa., v. 36, n. 1, p. 53-55, 1997.
- BALDUINI, C. L. et al. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. **Haematologica**, Pavia, IT, v. 88, n. 5, p. 582-592, 2003.
- BUDDE, U. et al. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, New York, v. 28, n. 2, p. 173-190, 2002.
- GRUPO COOPERATIVO ARGENTINO DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS. **Fundamentos para el manejo practico en el laboratorio de hemostasia**. Buenos Aires: Grupo CAHT, 2003.
- CASONATO, A. et al. The evaluation of factor VIII binding activity of von Willebrand factor by means of an Elisa method: significance and practical implications. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, Pa., v. 109, n. 3, p. 347-352, 1998.
- CATTANEO, M. Platelet aggregation studies autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. **Haematologica**, Pavia, IT, v. 92, n. 5, p. 694- 697, 2007.
- CHEN, D., et al. Validation of an automated latex particle-enhanced immunoturbidimetric von Willebrand factor activity assay. **J. Thromb. Haemost.**, Malden, MA, v. 9, n. 10, p. 1993-2002, 2011.
- EVANS, R.J., AUSTEN, D.E. Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. **Br J Haematol.**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 289-294, 1977.
- FAVALORO, E. J. et al. Development of a simple collagen based Elisa assay aids in the diagnosis of, and permits sensitive discrimination between type I and type II, von Willebrand's disease. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, London, v. 2, n. 2, p. 285-291, 1991.
- FAVALORO, E.J. Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of the differential utility of various functional von Willebrand factor assays. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, London, v. 22, n. 7, p. 553-564, 2011.
- FEDERICI, A. B. et al. Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. **Haemophilia**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 607-621, 2002.
- FEDERICI, A. B. et al. Proteolysis of von Willebrand factor is decreased in acute promyelocytic leukaemia by treatment with all-trans-retinoic acid. **Br J Haematol.**, Oxford, v. 92, n. 3, p. 733-739, 1996

- Forbes, C. D. M. , R (1991). Genetic disorders of blood coagulation. **Clinical presentation and management**. Philadelphia, WB Saunders Company: 141-202.
- HARRISON, P. Assessment of platelet function in the laboratory. **Hamostaseologie**, Stuttgart, v. 29, n. 1, p. 25-31, 2009.
- HASSAN, Amy A.; KROLL, Michael H. Acquired disorders of platelet et function. **Hematology**. Newark, NJ, n. 1, p. 403-408, 2005.
- HAY, C. R. et al. The diagnosis and management of factor VIII and IX inhibitors: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. **Br J Haematol.**, Oxford, v. 111, n. 1, p. 78-90, 2006.
- INGERSLEV, J. A sensitive Elisa for von Willebrand factor (vWf:Ag). **Scand. J. Clin. Lab. Invest.** Oxford, v. 47, n. 2, p. 143-149, 1987. Supplement.
- KASPER, C. K. **Diagnosis and management of inhibitors to factor VIII and IX**: treatment of hemophilia. Montreal: WFH, 2004.
- KEY, N. S. **Inhibitors in congenital coagulation disorders**. Br J Haematology, 127(4): 379-91, 2004.
- KITCHEN, S. et al. Lipid composition of seven APTT reagents in relation to heparin sensitivity. **Br. j. haematol.**, Oxford, v. 106, n. 3, p. 801-808, 1999.
- KITCHEN, S. ; MCCRAW, A.; ECHENAGUCIA, M. **Diagnosis of hemophilia and other bleeding disorders**: a laboratory manual. 2. ed. Montreal: WFH, 2010.
- KITCHENS, C. ; KESSLER, C. **Consultative hemostasis and thrombosis**. Philadelphia, PA: Saunders, 2002.
- KRIZEK, D. R. ; RICK, M. E. A rapid method to visualize von Willebrand factor multimers by using agarose gel electrophoresis, immunolocalization and luminographic detection. **Thrombosis research...**, Elmsford, NY, US, v. 97, n. 6, p. 457-462, 2000.
- LILLICRAP, D.; James, P. **Von Willebrand disease**: an introduction for the primary care physician. Montreal: WFH, 2009.
- LILLICRAP, D. **The basic science, diagnosis, and clinical management of von Willebrand disease**. Montreal: WFH, 2008.
- MANI, H. et al. Use of native or platelet count adjusted platelet rich plasma for platelet aggregation measurements. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 58, n. 7, p. 747-750, 2005.
- MCPHERSON, R. A. ; PINCUS, M. R. **Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods**. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2006.
- MICHELSON, A. D. Methods for the measurement of platelet function. **Am. J. Cardiol.**, Dallas, v. 103, p. 20A-26A, 2009. Supplement 3.

NICHOLS, W. L. et al. Von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). **Haemophilia**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 171-232, 2008.

ROBERT, H. ; AULT, K. ; Rinder, H. **Hematologie en pratique clinique**: guide de diagnostic et de traitement. Cachan, FR: Médecine Sciences Publications, 2007.

SAMPOL, J. **Manuel d'Hemostase**. Paris: Elsevier, 1995.

SANTILLI, J. C. **Adequação dos laboratórios clínicos para o atendimento aos requisitos da RDC-ANVISA n. 302**. Brasília: Anvisa, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de diagnóstico e tratamento da doença de von Willebrand**. Brasília, Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Hemofilia congênita e inibidor, manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

SHARATHKUMAR, A. A. ; Shapiro A. **Platelet function disorders**. Montreal: WFH, 2008.

SILVA, S. S. C. **Aplicação do teste de ligação do fator de von Willebrand ao colágeno em pacientes portadores da doença de von Willebrand**. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Validation of coagulation assay, instruments and reagents**: clinical and laboratory standards institute: protocol for evaluation, validation, and implementation of coagulometers: approved guideline. Wayne, PA: CLSI, 2008. H57-A, v. 28.

KITCHEN, S. ; MCCRAW, A. ; ECHENAGUCIA, M. **Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders**: a laboratory manual: prepared for The World Federation of Hemophilia laboratory sciences committee. Montreal: WFH, 2010.

VERBRUGGEN, B. et al. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart, v. 86, n. 6, p. 1435-1439, 2001.

VERBRUGGEN, B. et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart, v. 73, n. 2, p. 247-251, 1995.

VERBRUGGEN, B. et al. A 4% solution of bovine serum albumin may be used in place of factor VIII:C deficient plasma in the control sample in the Nijmegen Modification of the Bethesda factor VIII:C inhibitor assay. **Thrombosis and haemostasis**, Stuttgart, v. 88, n. 2, p. 362-364, 2002.

ZHOU, L. ; SCHMAIER, A. H. Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, PA, v. 123, n. 2, p. 172-183, 2005.



POLÍTICA NACIONAL DE  
SANGUE E HEMODERIVADOS



Ouvidoria Geral do SUS  
[www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde  
[www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs)



Ministério da  
Saúde

