

MINISTÉRIO DA SAÚDE

Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias

Brasília – DF
2016



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Atenção à Saúde
Departamento de Atenção Especializada

Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias



Brasília – DF
2016

2016 Ministério da Saúde.



Esta obra é disponibilizada nos termos da Licença Creative Commons – Atribuição – Não Comercial – Compartilhamento pela mesma licença 4.0 Internacional. É permitida a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

A coleção institucional do Ministério da Saúde pode ser acessada, na íntegra, na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde: <www.saude.gov.br/bvs>.

Tiragem: 1ª edição – 2016 – versão eletrônica

Elaboração, distribuição e informações:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria de Atenção a Saúde
Departamento de Atenção Especializada e Temática
Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados
SAF Sul, Trecho 2, Edifício Premium, torre 2, sala 202
CEP: 70070-600 – Brasília/DF
Tel.: (61) 3315-6155
Site: www.saude.gov.br
E-mail: sangue@saude.gov.br

Coordenação:

Helder Teixeira Melo – CGSH/DAET/SAS
João Paulo Baccara Araújo – CGSH/DAET/SAS

Elaboração de Texto

Daniella Cabral Stelzer Dazzi – Hemocentro do Espírito Santo (Hemoes)
Eliane Bandinelli – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Gisele Marília Pianetti Sternick – Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados (CGSH/DAET/SAS)
Jaqueline Alves da Costa Parente – Hemocentro de Tocantins (Hemoto)
José Wander Breganó – Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Silmara Aparecida Lima Montalvão – Universidade de Campinas (Unicamp)
Tânia Rúbia Flores da Rocha – Universidade de São Paulo (USP)

Revisão Técnica:

José Wander Breganó – Universidade Estadual de Londrina (UEL)
Tânia Rúbia Flores da Rocha – Universidade de São Paulo (USP)

Editora responsável:

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Secretaria-Executiva
Subsecretaria de Assuntos Administrativos
Coordenação-Geral de Documentação e Informação
Coordenação de Gestão Editorial
SIA, Trecho 4, lotes 540/610
CEP: 71200-040 – Brasília/DF
Tels.: (61) 3315-7790 / 3315-7794
Fax: (61) 3233-9558
Site: <http://editora.saude.gov.br>
E-mail: editora.ms@saude.gov.br

Equipe editorial:

Normalização: Daniela Ferreira Barros da Silva
Revisão: Khamila Silva e Tatiane Souza
Capa, Ilustrações, projeto gráfico e diagramação:
Leonardo Gonçalves

Ficha Catalográfica

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

Manual de diagnóstico laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

140 p. : il.

Modo de acesso: World Wide Web: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_diagnostico_coagulopatias_hereditarias_plaqueopatias.pdf>
ISBN 978-85-334-2427-2

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

CDU 616.151

Catalogação na fonte – Coordenação-Geral de Documentação e Informação – Editora MS – OS 2016/0340

Título para indexação:

Laboratory Guideline of Diagnosis in Hereditary Coagulopathies and Platelet Disorders

1	INTRODUÇÃO	5
2	CONDIÇÕES MÍNIMAS PARA O FUNCIONAMENTO DE UM LABORATÓRIO DE HEMOSTASIA	6
3	TÉCNICA MANUAL E EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS PARA OS TESTES DE HEMOSTASIA	8
4	COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAGEM DE AMOSTRAS PARA COAGULAÇÃO E SUAS VARIAÇÕES PRÉ-ANALÍTICAS	9
	4.1 Coleta	9
	4.2 Transporte de amostras	13
	4.2.1 Transporte de amostra de sangue total em rotina laboratorial	13
	4.2.2 Transporte de amostra de plasma para outra instituição	13
	4.2.3 Processamento e estocagem de amostra de plasma	15
5	AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E DOS TESTES DE COAGULAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO INTERVALO NORMAL DE REFERÊNCIA	18
	5.1 Programa de validação do sistema analítico	19
	5.1.1 Precisão	19
	5.1.2 Exatidão	20
	5.1.3 Intervalo analítico de medida	20
	5.1.4 Carreamento	21
	5.2 Determinação de um intervalo normal de referência	21
6	IMPLANTAÇÃO DOS CONTROLES DE QUALIDADE INTERNO E EXTERNO NO LABORATÓRIO DE HEMOSTASIA	23
	6.1 Controle de qualidade interno no Laboratório de Hemostasia	24
	6.1.1 Controle de qualidade na etapa pré-analítica	24
	6.1.1.1 Coleta de amostras	24
	6.1.1.2 Descongelamento das amostras de plasma citratado	24
	6.1.2 Controle de qualidade na etapa analítica	25
	6.1.2.1 Material para controle de qualidade interno	25
	6.1.2.2 Limites de aceitabilidade e variação	26
	6.1.3 Controle de qualidade na etapa pós-analítica	27
	6.2 Controle de qualidade externo no laboratório de hemostasia	27
7	PREPARAÇÃO DE <i>POOL</i> DE PLASMAS NORMAIS	29
	7.1 Coleta e preparação do <i>pool</i> de plasma normais	29
	7.2 Preparação do <i>pool</i> de plasmas normais para teste quantificação de inibidor de fator pelo método de Bethesda modificado (método Nijmegen)	30
8	TESTES DE TRIAGEM	32
	8.1 Tempo de protrombina – TP	32
	8.1.1 Curva de calibração para a determinação da atividade da protrombina	33
	8.1.2 Relação Normalizada Internacional – RNI	34

8.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada – TTPA	35
8.3 Tempo de Trombina – TT	37
9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS COAGULOPATIAS HEREDITÁRIAS	39
9.1 Diagnóstico laboratorial da doença de von Willebrand	39
9.1.1 Introdução	39
9.1.2 Diagnóstico	40
9.1.3 Testes laboratoriais	41
9.1.4 Interpretação dos resultados	69
9.1.5 Considerações	69
9.1.6 Recomendações para coleta e processamento da amostra	70
9.1.7 Variabilidade dos testes laboratoriais	71
9.2 Hemofilia	71
9.2.1 Diagnóstico e acompanhamento laboratorial das hemofilias	72
9.3 Coagulopatias raras	86
9.3.1 Deficiência de fator VII	86
9.3.2 Deficiência de fator V	89
9.3.3 Deficiência de fator X	91
9.3.4 Deficiência de fator XI	94
9.3.5 Deficiência de fator XII	96
9.3.6 Deficiência de fator XIII	98
9.3.7 Deficiência de fibrinogênio (fator I)	99
9.3.8 Deficiência de fator II (protrombina)	101
10 PLAQUETOPATIAS	104
10.1 Introdução	104
10.2 Alterações plaquetárias quantitativas: plaquetopenias e plaquetoses	106
10.2.1 Plaquetopenias adquiridas	106
10.2.2 Plaquetopenias hereditárias	107
10.3 Alterações plaquetárias qualitativas (plaquetopatias)	111
10.3.1 Plaquetopatias hereditárias	111
10.3.2 Plaquetopatias adquiridas	112
10.4 Testes laboratoriais	113
10.4.1 Testes de triagem	114
10.4.2 Testes específicos	115
10.5 Testes especiais	129
10.5.1 Avaliação de secreção plaquetária	129
10.5.2 Citometria de fluxo	130
10.5.3 Microscopia eletrônica	131
10.6 Novos equipamentos para a avaliação da função das plaquetas	131
10.6.1 Analisador de função plaquetária	132
10.6.2 VerifyNow	133
10.6.3 Impact R	133
REFERÊNCIAS	134
BIBLIOGRAFIA	136

1 INTRODUÇÃO

O *Manual de Diagnóstico Laboratorial das Coagulopatias Hereditárias e Plaquetopatias* foi elaborado por profissionais de laboratório que atuam na área de hemostasia e tem como objetivo principal abordar os principais aspectos dos testes laboratoriais necessários para o diagnóstico das coagulopatias e plaquetopatias.

Trata-se de um guia que não deve ser utilizado como fonte de referência única sobre o tema, ficando a cargo dos profissionais da área a complementação das informações e a atualização contínua com relação aos diagnósticos laboratoriais das doenças relacionadas.

Nessa edição, serão apresentadas algumas alterações e complementações de alguns procedimentos e técnicas referentes ao controle de qualidade dos testes, determinação de fatores de coagulação, quantificação de inibidor específico, testes de atividade do fator de von Willebrand e avaliação da função plaquetária.

2 CONDIÇÕES MÍNIMAS PARA O FUNCIONAMENTO DE UM LABORATÓRIO DE HEMOSTASIA

Apesar de vários testes de hemostasia serem realizados, atualmente em equipamentos semi e/ou totalmente automatizados, os testes de triagem de coagulação e a determinação de fatores de coagulação, que definem o diagnóstico da maioria das coagulopatias, podem ser realizados manualmente, com a mesma acuracidade.

Nos anos 70, foram introduzidos os aparelhos semiautomáticos, com princípio de detecção fotométrica ou mecânica da formação da fibrina. Em sequência, aparelhos totalmente automatizados e interfaceáveis com sistemas de informação foram desenvolvidos, proporcionando maior agilidade e confiabilidade na liberação de resultados em laboratórios clínicos de grande porte.

Diante do cenário de várias opções, ao planejar a criação de um laboratório de hemostasia, torna-se imperativo estimar o número de amostras a serem processadas e quais testes serão implantados para a aquisição adequada do equipamento e de insumos necessários para a avaliação do custo-benefício.

O projeto da área física laboratorial deve observar as 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 306, de 7 de dezembro de 2014, dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde.
- ▶ RDC nº 302, de 13 de abril de 2005, referente ao regulamento técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos.
- ▶ RDC nº 63, de 23 de novembro de 2011, dispõe sobre os

Requisitos de Boas Práticas de Funcionamento para os Serviços de Saúde.

No Quadro 1 estão listados alguns itens indispensáveis para o funcionamento de um Laboratório de Hemostasia.

Quadro 1 – Insumos básicos e equipamentos necessários para o funcionamento de um Laboratório de Hemostasia

Balança semianalítica.
Banho-maria 37°C, com estante para tubos de hemólise.
Centrífuga de bancada com capacidade mínima de rotação de 1.700 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 ou nitrogênio líquido.
Geladeira.
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 e di-log para gráficos.
Pipetas automáticas com volumes em microlitros: 50 µl, 100 µl, 200 µl e 1.000 µl.
Ponteiras descartáveis compatíveis com as pipetas automáticas.
Termômetro.
Tubos de hemólise de plástico ou vidro siliconizado (Pyrex nº 9.820).
Tubos para coleta de amostra com Citrato de Sódio 3,2%.

Fonte: (BRASIL; AGÊNCIA NACIONAL..., 2005).

*Temperatura ambiente ideal: 18°C a 25°C.

3 TÉCNICA MANUAL E EQUIPAMENTOS DISPONÍVEIS PARA OS TESTES DE HEMOSTASIA

A técnica manual, embora utilizada por poucos laboratórios de hemostasia, pode fornecer resultados confiáveis, quando realizada adequadamente. Além disso, é didática para o treinamento do pessoal técnico do laboratório.

A utilização de tubos de vidro siliconizado, ou de plástico, permite 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). Diferenças sistemáticas entre as técnicas manual e automatizada necessitam de novo intervalo de referência do laboratório.

4 COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAGEM DE AMOSTRAS PARA COAGULAÇÃO E SUAS VARIAÇÕES PRÉ-ANALÍTICAS

A fase pré-analítica envolve o preparo do paciente, coleta, transporte, processamento e armazenamento das amostras biológicas, estando sujeita a uma série de variáveis que podem comprometer a integridade da amostra e conseqüentemente produzir um erro laboratorial. Portanto, o controle das variáveis pré-analíticas é muito importante para que se obtenha confiabilidade e qualidade em todos os resultados dos testes de hemostasia.

4.1 Coleta

As amostras do paciente para realização dos testes de coagulação devem ser colhidas em jejum mínimo de 4 horas ou de 2 horas para lactantes, com utilização de seringa e/ou sistema a vácuo que permitam uma coleta rápida, em tubos de vidro siliconizados ou tubos de polipropileno.

O tubo deverá conter citrato de sódio di-hidratado 3,2% ou 0,109 mol/L, tamponado prevenindo o aumento no pH, o que pode afetar os resultados.

Caso o laboratório prepare o anticoagulante, a solução deverá ser estocada a 4°C no máximo por três meses, desde que seja sempre inspecionada quanto à presença de material particulado, significando contaminação por micro-organismos ou presença de cristais.

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

Nos casos em que o paciente apresentar valor de hematócrito acima de 55%, deve-se reajustar o volume de sangue a ser colhido ou do anticoagulante. Isso porque o excesso de anticoagulante em relação ao volume plasmático pode interferir nos tempos de coagulação dos testes. O ajuste do volume do anticoagulante ou de sangue é feito utilizando a seguinte fórmula:

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

Onde,

C = Volume de citrato;

HCT= Hematócrito do paciente;

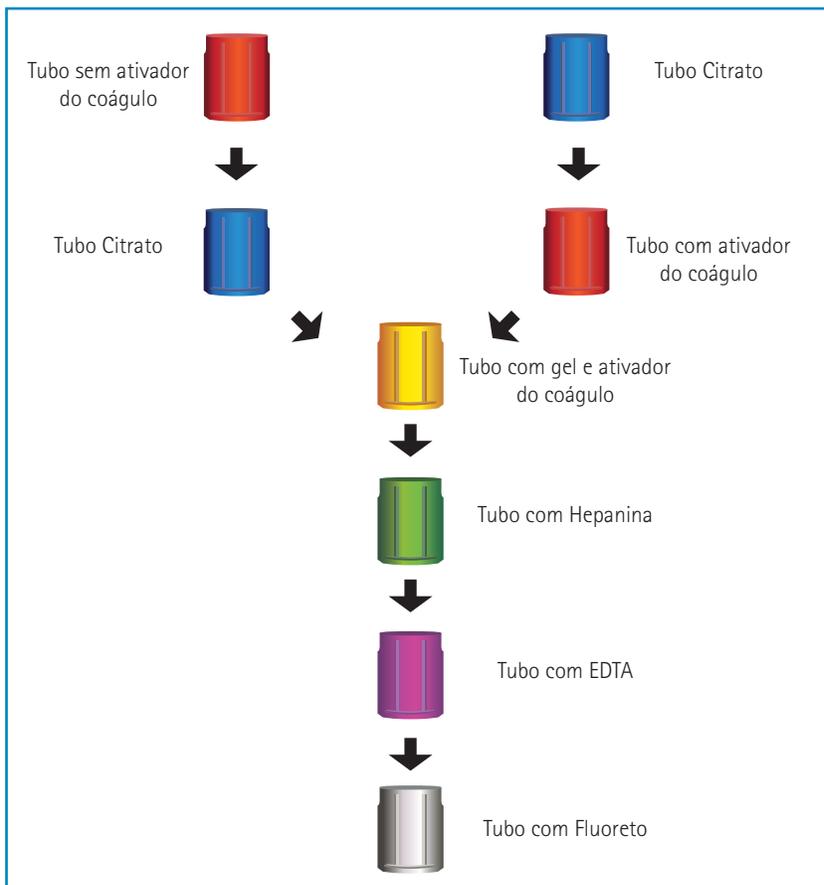
V= Volume de sangue adicionado (se o tubo for de 5 mL, então o volume será 4,5 mL).

Para hematócritos abaixo de 20%, não há informações disponíveis que sustentem a recomendação específica.

Vários cuidados devem ser tomados com o objetivo de reduzir as fontes de erros na fase pré-analítica, como:

- ▶ Observar o volume correto de sangue nos tubos após a coleta, a maioria dos tubos tem marcas indicando o volume mínimo e máximo de sangue.
- ▶ Escolha dos tubos de coleta, os tubos devem ser de polipropileno ou de vidro siliconizado. Atualmente, a maioria dos laboratórios utiliza tubos de polipropileno contendo vácuo suficiente para o volume de sangue desejado, que segundo a literatura não promove malefício à amostra. Para estudos de agregação plaquetária é recomendada a coleta do sangue com a de seringa.
- ▶ Homogeneização da amostra logo após a coleta, o sangue deve ser misturado com o anticoagulante delicadamente por inversão do tubo de 8 a 10 vezes, evitando a formação de espuma.
- ▶ Observar a sequência de tubos durante a coleta para evitar a contaminação indesejada entre os diferentes anticoagulantes (Figura 1). No caso de veias de difícil acesso é recomendável o descarte do primeiro tubo e sempre com anotação no pedido de exames do paciente para futuras interpretações.

Figura 1 – Sequência de tubos recomendada durante a coleta pelo sistema a vácuo



Fonte: (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA..., 2010, adaptado).

- ▶ Caso a coleta do sangue seja realizada com seringa agulhada, deve-se retirar a agulha antes de adicioná-lo no tubo aberto, pelas paredes. Jamais perfurar a tampa do tubo com a agulha para passagem do sangue.
- ▶ Escolher o calibre da agulha de acordo com o calibre do vaso. É recomendável o uso dos calibres: 25x6 (23G1), 25x7(22G1) e 25x8(21G1).

- ▶ Evitar garroteamentos prolongados, ou seja, acima de 1 minuto. Um procedimento que contribui para reduzir o tempo de estase sanguínea é o preparo de todo o material a ser utilizado na coleta antes de realizar o garroteamento.
- ▶ Evitar a coleta de sangue em acesso venoso periférico (cateter). Caso tenha que utilizar esse acesso, a orientação é o enxague da cânula com solução fisiológica e descarte de 5 mL de sangue, ou 6 vezes o volume da cânula. Desprezar o primeiro tubo ou utilizar o tubo de soro (sem ativador do coágulo) antes de coletar o sangue no tubo com citrato de sódio.
- ▶ Para evitar erros de identificação de amostras é recomendável que o flebotomista identifique o(s) tubo(s) antes da coleta do sangue.
- ▶ No caso de necessidade de nova coleta de amostra, anotar no pedido de exame o horário do procedimento. Esse cuidado deve ser tomado no caso de haver alterações fisiológicas, fisiopatológicas ou a realização de procedimentos como a transfusão de hemocomponentes ou uso de medicamentos, entre a primeira e a nova coleta.

A presença de hemólise na amostra talvez seja uma das principais fontes de erros, não só no laboratório de hemostasia, mas em laboratórios de maneira geral. A princípio a amostra com hemólise deve ser descartada a menos quando for inerente ao paciente. Por exemplo, casos em que o paciente foi submetido à circulação extracorpórea uma nova coleta não eliminará a hemólise. A hemólise dilui os fatores de coagulação, por liberação de líquido intracelular para o meio extracelular, e ocorre a exposição de componentes intracelular e de membrana que ativam a coagulação sanguínea. Como resultado, a presença de hemólise pode tanto encurtar como prolongar os testes de coagulação. Além disso, dependendo do grau da hemólise, pode haver interferência na detecção do coágulo por sistema óptico. As causas de hemólise durante a obtenção da amostra de sangue são diversas, mas podem-se destacar algumas:

- ▶ Garroteamento prolongado e tapinhas no vaso durante a coleta.
- ▶ Agitação do tubo.
- ▶ Inserção da agulha da seringa na tampa do tubo, já comentado anteriormente.
- ▶ Transporte inadequado, com agitação da amostra e/ou extremos de temperatura.
- ▶ Contado direto do sangue com o gelo.
- ▶ Coletas traumáticas.
- ▶ Uso de agulhas de baixo calibre.

4.2 Transporte de amostras

4.2.1 Transporte de amostra de sangue total em rotina laboratorial

O transporte de amostra de sangue total em gelo (2°C-8°C) não é recomendado para a maioria dos testes de coagulação que utilizam plasma, devido à de ativação dos fatores VII e FVW em baixas temperaturas, além de promover ativação plaquetária. É importante que o laboratório tenha o controle do transporte e o do tempo entre a coleta e o processamento das amostras.

4.2.2 Transporte de amostra de plasma para outra instituição

As amostras dos pacientes que serão analisadas em outra instituição deverão preferencialmente ser enviadas na forma de plasma devidamente acondicionado em tubo plástico, congelado e mantido em gelo seco. É importante salientar que o plasma deverá chegar ao local de destino totalmente congelado. Já as amostras para quantificação de inibidores de fatores podem ser enviadas apenas sob refrigeração.

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 observados antes do envio.

De acordo com o manual International Air Transport Association (IATA) – Dangerous Goods Regulations (DGR), amostras em gelo seco são considerados 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 contêineres (com estantes) fechados contendo os tubos com as amostras congeladas equidistantes entre si e das paredes da caixa do isopor.
- ▶ Cobrir os contêineres 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 dela.
- ▶ Encaixar a tampa da caixa de isopor e selar.
- ▶ Colocar na embalagem as informações do remetente e do 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.

4.2.3 Processamento e estocagem de amostra de plasma

Quanto ao processamento da amostra de sangue para a obtenção do plasma, deve-se atentar para a centrifugação, que deverá ser realizada à temperatura ambiente. No entanto, algumas centrífugas podem aumentar a temperatura interior no processo de centrifugação. Dessa forma, recomenda-se a utilização de centrífuga refrigerada com rotor horizontal, regulada em temperatura entre 18°C a 20°C. No caso de obtenção de plasma pobre em plaquetas (PPP), se a centrífuga estiver devidamente calibrada, a rotação de 1.700 g por 10 minutos ou 1.500 g por 15 minutos será suficiente para a obtenção de um plasma contendo um número de plaquetas abaixo de 10 mil/mm³. Caso não se obtenha este número de plaquetas, pode-se optar pela dupla centrifugação, ou seja, após a primeira centrifugação, o plasma deve ser retirado e colocado em tubo plástico e centrifugado novamente nas mesmas condições.

Quanto à estocagem de amostras, de acordo com a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o manual da Federação Mundial de Hemofilia (FMH), algumas considerações de tempo e temperatura devem ser respeitadas (Tabela 1). No entanto, muitos laboratórios utilizam *freezers* domésticos, que não são adequados para laboratório, devido a sua incapacidade em manter a temperatura a -20°C após a abertura da porta. Assim, a Federação Mundial de

Hemofilia não recomenda o armazenamento de amostras de plasma a -20°C e sim abaixo de -35°C por 15 dias, -70°C por 12 meses e até 6 anos no caso de amostras destinadas aos testes Tempo de trombotoplastina parcial ativada (TTPA), determinação do fator VIII e FvW.

Tabela 1 – Tempo de transporte e estocagem de amostras para testes de coagulação

Determinações	Sangue total		Plasma		
	TA	Refrigerado	TA	Refrigerado	Congelado
TP	Até 4h*	Não	Até 4h	Não	- 20°C por
TTPA e Fibrinogênio	Até 4h	Até 4h*	Até 4h	Até 4h	
Fatores (VIII e IX)	Até 4h	Não	Até 4h	Até 4h	
TTPA para análise de heparina não fracionada	Até 1h	Desconhecido	Até 4h	Até 4h	2 semanas
Dosagem de inibidores	Até 48h*	Até 48h*	Até 48h*	Até 48h*	ou
Fator de vW antígeno e atividade	4h	Não	4h	Não	- 70°C por
Agregação plaquetária	1h	Não	Não	Não	6 meses

Fonte: Adaptado de CSLI – 5ª edição 2008.

Abreviações: TA – temperatura ambiente; TP – tempo de Protrombina; TTPA – tempo de trombotoplastina parcialmente ativado; FVIII – fator VIII; FvW – fator de von Willebrand.

*Tempos de estocagem recomendados pelo CAT – Hemostasia. Obs.: A Federação Mundial de Hemofilia não recomenda a temperatura -20°C para armazenagem de fator VIII enquanto que a CSLI 2008 permite a armazenagem nesta temperatura.

Em resumo, os cuidados que devem ser considerados no transporte e na estocagem das amostras são:

- ▶ Evitar tempos prolongados de processamento do sangue total para não ocorrer hemólise.
- ▶ O congelamento das amostras deve ser rápido e pode ser realizado com nitrogênio líquido ou em banho de gelo seco com álcool.
- ▶ O descongelamento também deve ser realizado de maneira rápida em banho-maria a 37°C e mantidos por 5 minutos, homogeneizar a amostra após o descongelamento.

- ▶ O estoque do plasma em temperatura de -20°C é inadequado para os fatores de coagulação, principalmente no caso do fator VIII, com rápido decaimento da atividade nessa temperatura.
- ▶ Evitar agitação e vibração no transporte, principalmente em sistema pneumático.
- ▶ Amostras congeladas devem ser pobres em plaquetas, abaixo de 10 mil/mm^3 .
- ▶ Para o transporte de amostra para quantificação de inibidores não há necessidade de congelar o plasma, somente manter refrigerado.
- ▶ Amostras para controle de heparina não fracionada devem ser centrifugadas em até 1 hora após a coleta devido à liberação do PF4 (presente nas plaquetas com função neutralizadora de heparina) e o TTPA deve ser realizado em até 4 horas.
- ▶ Para a determinação de fatores de coagulação, as amostras devem ser transportadas em gelo seco e mantidas congeladas até o destino.
- ▶ Para o teste de função plaquetária, o sangue deve ser coletado próximo ao local onde é realizado o teste devido à ativação das plaquetas durante o transporte.
- ▶ Não é recomendado o congelamento e o descongelamento da amostra mais de uma vez.

5 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE EQUIPAMENTOS E DOS TESTES DE COAGULAÇÃO E DETERMINAÇÃO DO INTERVALO NORMAL DE REFERÊNCIA

A validação de um sistema analítico compreende um conjunto de experimentos que forneça dados que permitam determinar o seu desempenho quanto à exatidão, à precisão e ao intervalo analítico. Para decidir sobre a aceitação ou não do sistema analítico é preciso comparar o erro analítico obtido, associação do erro aleatório (imprecisão) e erro sistemático (inexatidão), com o erro total aceitável. Ou seja, a análise de desempenho permite concluir se um método, procedimento, sistema, equipamento ou processo proporciona resultados adequados.

Antes dos procedimentos de validação é recomendada a realização de uma avaliação das características do sistema analítico a ser implantado para verificar se estão de acordo com as necessidades exigidas pelo laboratório. Essas características podem ser obtidas dos próprios fornecedores do sistema analítico em questão.

Conforme CSLI H21-A5, algumas dessas características são:

- ▶ Volume mínimo da amostra.
- ▶ Velocidade de processamento (número de teste por hora).
- ▶ Capacidade de inserir amostras emergências (STAT).
- ▶ Menu de testes disponíveis.
- ▶ Procedimentos de calibração.
- ▶ Utilização de tubos primários.
- ▶ Capacidade de autodiluição.
- ▶ Capacidade de autorrepetição.

- ▶ Sistema de refrigeração e homogeneização dos reagentes.
- ▶ Desempenho analítico: precisão, exatidão, interferentes, linearidade, estabilidade dos reagentes, carreamento (*carryover*).
- ▶ Capacidade de interfaceamento.
- ▶ Armazenamento de dados.
- ▶ Controle de qualidade normal e patológico com gráfico de Levey-Jennings.
- ▶ Suporte técnico quanto à manutenção preventiva e corretiva.
- ▶ Descarte e geração de resíduos.

É fundamental que cada laboratório planeje um programa de validação de acordo com as características da sua rotina laboratorial. Para orientar a implantação deste programa, algumas características de desempenho devem ser seguidas, tais como exatidão, precisão e intervalo analítico.

5.1 Programa de validação do sistema analítico

Como comentado anteriormente, cada laboratório deve estabelecer o seu programa de validação para um sistema analítico. Porém, é necessário que este programa compreenda alguns experimentos para determinar o seu desempenho quanto à precisão, à exatidão, a interferentes, ao intervalo analítico, à estabilidade dos reagentes e carreamento (arreste ou *carryover*).

5.1.1 Precisão

A precisão mostra a capacidade do método em apresentar resultados próximos entre si em determinações repetidas de uma mesma amostra. A precisão é determinada pelo cálculo do desvio padrão em uma série de repetições na mesma amostra.

A precisão pode ser intraensaio (ou repetitividade de resultados) quando as repetições são realizadas em um curto espaço de tempo e nas mesmas condições de medida. Ou seja: mesmo operador, equipamento e reagentes. A precisão interensaio (ou reprodutibilidade de resultados) é obtida quando as repetições são realizadas em condições alteradas de medida e em tempos espaçados. Geralmente a reprodutibilidade é avaliada pela utilização de um controle interno da qualidade, que será discutido no Capítulo 6.

5.1.2 Exatidão

A exatidão está relacionada à capacidade do método em apresentar resultados próximos do valor verdadeiro, ou seja, a exatidão é a concordância entre o valor encontrado de um analito e seu valor real. Uma das maneiras de verificar o grau de exatidão de um sistema analítico é a participação de um programa de qualidade externo em que os resultados observados são comparados com diversos laboratórios que utilizaram a mesma amostra e metodologia. Os laboratórios que obtiverem resultados próximos da média do seu grupo possuem um sistema analítico com grau de exatidão adequado.

5.1.3 Intervalo analítico de medida

Intervalo analítico de medida é o intervalo de concentração de um método de análise em que a determinação pode ser realizada sem a necessidade de qualquer diluição, concentração, ou outro pré-tratamento da amostra que não faça parte do processo de ensaio habitual. Esse intervalo compreende valor mínimo detectável (sensibilidade) e o valor máximo detectável (linearidade). Para este estudo, podem-se utilizar diluições seriadas de amostras de concentrações altas e baixas. Para cada diluição os testes são realizados em replicatas e, a partir dos resultados, elabora-se um gráfico de dispersão e determina-se a regressão linear. Pode-se realizar uma análise visual do gráfico observando se os pontos estão próximos da reta de regressão. Porém, a forma mais objetiva de avaliar é por critérios estatísticos.

5.1.4 Carreamento

Os estudos de carreamento (arraste ou *carryover*) têm como objetivo avaliar a interferência de uma reação inicial para outra reação subsequente de um analito. A interferência pode ser devido à contaminação de reagentes ou de amostras entre as reações.

Outros estudos podem ser realizados como experimentos de recuperação, de robustez, de estabilidades de reagentes e interferentes, como lipemia, icterícia e hemólise.

5.2 Determinação de um intervalo normal de referência

Para a correta interpretação dos resultados dos testes de hemostasia é fundamental que estes resultados sejam comparados com os resultados de uma população saudável, ou seja, com os valores de referência de normalidade. A seleção de indivíduos para a determinação destes valores deve ser feita considerando a praticidade e a representatividade de cada população ou grupo. Frequentemente se utilizam doadores de sangue após triagem clínica e laboratorial. É importante que os valores de referência sejam determinados quando ocorrer alterações significativas nas diferentes fases de realização dos exames laboratoriais. Para alguns testes é necessário determinar os valores de referência de acordo com o grupo de indivíduos ao qual o paciente pertence, como a idade e o sexo. No caso de FVIII e fator de von Willebrand deve-se considerar o grupo sanguíneo ABO.

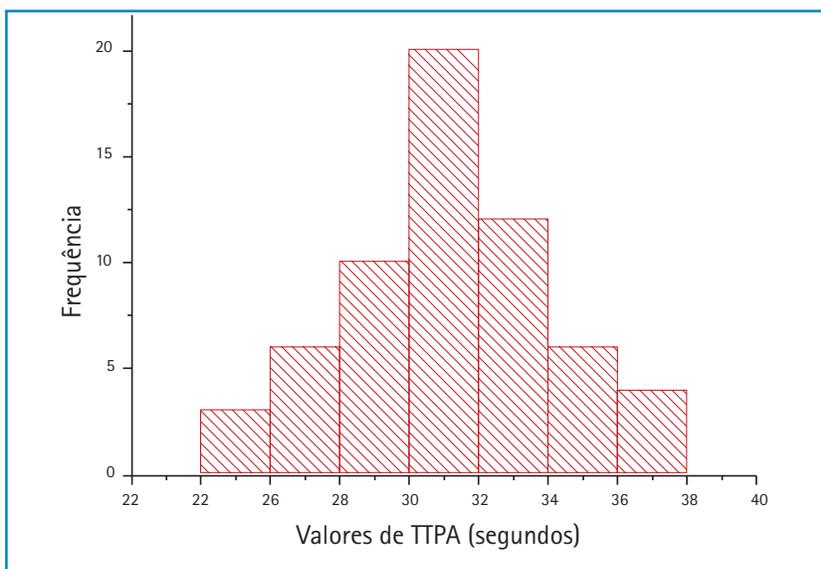
Valores de referência de normalidade devem ser estabelecidos localmente para os testes de coagulação, principalmente TP e TTPA. É possível que um novo lote de reagente da mesma marca tenha uma faixa de referência diferente do anterior. As mudanças nos resultados dos controles internos com o novo lote podem indicar a necessidade de estabelecer um novo valor de referência.

O número ideal de indivíduos saudáveis para se estabelecer os valores de referência é no mínimo de 120 indivíduos. Porém, pela dificuldade de se obter este número, a Federação Mundial de Hemofilia sugere uma população mínima de 30 indivíduos saudáveis.

Os resultados obtidos devem seguir distribuição normal ou curva de Gauss, caso contrário deve-se aumentar o número de amostras que se obtenha esta distribuição. Para verificar se os resultados possuem distribuição normal pode-se construir um histograma (Figura 2) ou aplicar um teste estatístico adequado, por exemplo, o Teste de Shapiro-Wilk. O valor de referência deverá conter 95% dos valores desta curva. Caso a distribuição seja normal, deve-se, então, calcular a média e o desvio padrão dos valores e usar, como faixa de normalidade, o resultado de dois desvios padrão para o limite inferior e superior.

Os valores de referência de normalidade do laboratório devem ser estabelecidos seguindo as considerações importantes, como: I – devem ser estabelecidos empregando uma população local; II – os valores de referência da literatura e os fornecidos pelo fabricante devem ser utilizados somente como um guia; III – as amostras devem ser colhidas, processadas e analisadas utilizando-se os mesmos procedimentos que as amostras dos pacientes.

Figura 2 – Histograma de distribuição normal de resultados de TTPA de uma população saudável



Fonte: Autoria própria.

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 para o correto diagnóstico do paciente. Isso inclui a escolha do teste, a coleta da amostra, a obtenção do resultado de maneira correta, a 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, mas complementares, dentro 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 diários do laboratório. O CQE é utilizado para identificar o grau de concordância entre laboratórios que operam com os mesmos métodos, reagentes e equipamentos. Dessa forma, o CQI propõe avaliar a precisão dos resultados por meio da sua reprodutibilidade e o CQE avalia a exatidão deste mesmo resultado. 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 a rotina laboratorial.

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 por intermédio de instruções de trabalho ou procedimento operacionais padrão (POP), aprovadas e colocadas à disposição do corpo técnico e de apoio. Os POPs (ou PO) são documentos que descrevem detalhadamente cada processo do laboratório.

Contudo, é importante ressaltar que a implantação de um programa de qualidade envolve o controle de vários processos sendo que cada

um apresenta fontes potenciais de erro. A recomendação é considerar as seguintes etapas na implantação: (1) Etapa pré-analítica, (2) Etapa analítica e (3) Etapa pós-analítica.

O programa dependerá de um fluxo da rotina de cada laboratório não havendo, assim, um protocolo pronto a seguir e sim cada laboratório deverá estabelecer seu próprio programa de qualidade que contemple os CQI e CQE.

A seguir estão descritas algumas recomendações que podem ser utilizadas como guia.

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 a seguir 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 realizados 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 os valores estiverem prolongados.

6.1.1.2 Descongelamento das amostras de plasma citratado

As amostras de plasma descongeladas de forma inadequada podem apresentar níveis diminuídos de fator VIII, FVW e fibrinogênio, devido à presença de crioprecipitado. As amostras devem ser descongeladas preferencialmente em banho-maria a 37°C por um período de aproximadamente 5 minutos e homogeneizadas em seguida, antes da realização dos testes.

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. Por meio do controle de qualidade na etapa analítica (CQI-EA), pode-se avaliar a confiabilidade e a eficiência dos procedimentos laboratoriais na geração de resultados que contribuem para o diagnóstico do paciente. Dessa forma, o controle de qualidade diário avalia não só a reprodutibilidade (precisão), mas também a calibração do sistema e indica o momento em que se devem promover ações corretivas em situações de não conformidade.

6.1.2.1 Material para controle de qualidade interno

Para a avaliação da precisão de um método é necessário a realização de várias análises consecutivas de uma mesma amostra, incluindo amostras com valores normal e anormal, controlando assim diferentes índices de resultados. O plasma controle deve ser similar e analisado no mesmo momento em que for analisada a amostra teste, utilizando o mesmo método. Especificamente para testes de coagulação, o material de controle deve ser estocado a -80°C ou estar na forma liofilizada para não comprometer sua estabilidade e, por conseguinte, os resultados. O descongelamento deve ser realizado a 37°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 e a cada 8 horas para os laboratórios que funcionam 24 horas. Em todos os casos, o plasma controle deve ser tratado da mesma forma que a amostra teste.

São quatro os tipos de materiais indicados para controle de qualidade interno do laboratório de coagulação:

1. Controle normal (origem comercial).
2. Controle anormal (origem comercial).
3. *Pool* de plasmas normais (geralmente preparado no laboratório).
4. Plasma de paciente com coagulopatia diagnosticada.

Os controles de origem comercial são mais utilizados devido à maior estabilidade quando comparados ao *pool de plasmas normais* (PPN), preparado pelo laboratório. Por outro lado, o PPN se aproxima mais das características da amostra teste, sendo essencial a sua inclusão no painel de controle de qualidade interno do laboratório.

O plasma de um paciente com coagulopatia é de grande valia como controle patológico, principalmente se a deficiência for grave. 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 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) na RDC nº 302 que normatiza procedimentos de laboratório clínico.

6.1.2.2 Limites de aceitabilidade e variação

Quando os resultados dos controles de qualidade internos são plotados em um gráfico e comparados aos limites aceitáveis de variação para aquele analito, isto é, dentro da média mais ou menos dois desvios padrão, conclui-se que o método analítico está funcionando adequadamente. Caso contrário, é um alerta para a equipe quanto a possíveis problemas no processo decorrentes ao método, ao reagente, ao equipamento ou ao laboratorista.

Atualmente, há 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.

O sistema de controle de qualidade interno ideal deve:

1. Prever a avaliação do desempenho de métodos, equipamentos e técnicas.
2. Fornecer informações sobre a exatidão e a precisão de cada método.
3. Ter sensibilidade suficiente para detectar variações nas diversas fases do ensaio.

4. Ser fácil de implantar, manter e interpretar.
5. Ser capaz de revelar os diversos tipos de erros ou variações que possam ocorrer.

Os sistemas de controle de Levey-Jennings e regras Westgard, que são empregados na maioria dos laboratórios, auxiliam a entender a não conformidade informando o tipo de erro, se sistemático, ou aleatório. A partir dessa classificação surge uma lista de possibilidades, para o encontro da causa raiz do problema.

As amostras para CQI comerciais são providas com bulas que fornecem intervalo de resultado aceitável. No entanto, os resultados obtidos são dependentes dos reagentes empregados e do método de detecção. 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 controle de variação (CV)% dos resultados em diferentes dias para TP e TTPA deve ser menor que 8%, preferencialmente 2% a 3%. Para os outros ensaios, tal como determinação de fatores da coagulação, o CV% não deve ultrapassar 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. Eles 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 determinação dos fatores de coagulação, descrita 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 entre laboratórios. O CQE visa

padronizar os resultados de laboratórios diferentes por meio 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 utiliza na rotina. Com a participação efetiva neste programa o laboratório pode assegurar que os seus resultados se aproximem 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 melhor desempenho individual, assim como a menor variabilidade dos resultados. Há muitas razões possíveis para um laboratório produzir um resultado insatisfatório, essas razões podem ser imediatamente identificadas. Por outro lado, a pontuação 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 DE *POOL* DE PLASMAS NORMAIS

7.1 Coleta e preparação do *pool* de plasma normais

O *pool* de *plasmas normais* (PPN) local poderá ser preparado coletando-se sangue de 20 a 40 pessoas sadias e que não tenham usado medicamentos, nos últimos 10 dias, que possam interferir nos testes de hemostasia.

É importante salientar que o número de doadores para composição do PPN deve representar distribuição normal, por isso recomenda-se que quanto maior o número de doadores e a mesma proporção entre homens e mulheres, com idade entre 20 a 50 anos, melhor será a qualidade do *pool*.

Instruções para o preparo do PPN:

1. Todo o procedimento, desde a coleta até o congelamento, não deve exceder a quatro horas.
2. Após a coleta as amostras devem ser centrifugadas conforme indicado no item 4.2.3.
3. As amostras hemolisadas e lipêmicas devem ser desprezadas.
4. Manter as amostras de plasma em temperatura ambiente (18°C a 25°C), durante a preparação.
5. Deve-se pipetar a mesma quantidade de plasma de cada amostra coletada.
6. Os plasmas devem ser misturados em recipiente plástico e evitando a formação de bolhas.
7. A dupla centrifugação do *pool* é aconselhável para a retirada completa das plaquetas.
8. Após o preparo o *pool* deverá ser testado para os testes de TP e TTPA.

9. Para o uso na rotina laboratorial, alíquotas mínimas de 0,5 mL a 1,0 mL devem ser acondicionadas em microtubos plásticos tipo *ependorf* com tampa ou tubos de criopreservação.
10. Identificar os tubos com data de realização e o nome do técnico responsável pela preparação.
11. Congelar as alíquotas rapidamente, seguidas de armazenamento em estantes identificadas com a sigla "PPN". Depois descongelada para uso, a alíquota de *pool* não poderá ser congelada novamente.
12. O PPN deve ser utilizado como parâmetro de CQI em ensaios posteriores.
13. A validade do *pool* varia de acordo com as condições de armazenamento, três meses se armazenado a -35°C e seis meses a -80°C .

7.2 Preparação do *pool* de plasmas normais para teste quantificação de inibidor de fator pelo método de Bethesda modificado (método Nijmegen)

A quantificação de inibidor pelo método Bethesda modificado, desenvolvido por B. Verbruggen em 1995 atualmente é o de escolha, por ser mais específico e sensível quando comparado ao Bethesda clássico. Uma das modificações desse método é a utilização de um *pool* tamponado para fazer a mistura com o plasma do paciente contendo o inibidor de fator. O tamponamento confere ao plasma normal maior estabilidade durante o processo de incubação da mistura por duas horas a 37°C . A sua procedência pode ser comercial (plasma calibrador) ou preparado em laboratório.

Instruções de preparo do *pool* tamponado:

São descritas duas formas diferentes de preparo de qualidade semelhante.

Preparo 1 – Coleta do sangue em tubos de polipropileno ou siliconizados contendo o anticoagulante citrato de sódio 0,109 M (3,2%) previamente tamponado com imidazol sólido. A proporção de mistura é a cada 25 ml da solução de citrato de sódio 0,109 M, adiciona-se 1,7 g de imidazol sólido.

Preparo 2 – Coleta do sangue em tubos de polipropileno ou siliconizados contendo o anticoagulante citrato de sódio 0,109 M (3,2%) previamente tamponado com o sal Hepes (Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico). Para cada 25 mL de citrato de sódio 3,2% adicionar 1,25g de Hepes.

Para evitar resultados falso-positivos é importante assegurar que o *pool* tamponado tenha cerca de 100% de fator VIII em todas as formas de preparo.

8 TESTES DE TRIAGEM

8.1 Tempo de protrombina – TP

O TP avalia as vias extrínseca e comum da coagulação. É sensível às deficiências dos fatores V, VII e X e menos sensível a deficiência de fator II e às formas leves de deficiência de fibrinogênio.

O reagente de TP, geralmente denominado de tromboplastina, consiste de mistura de fator tecidual e cálcio. O fator tecidual pode ser obtido de várias fontes: placenta humana, tecido cerebral de porco, coelho ou bovino ou ainda ser obtida de forma recombinante (fator tecidual humano recombinante).

O teste consiste na adição de tromboplastina cálcica previamente aquecida a 37°C ao plasma citratado, na mesma temperatura. O tempo de coagulação do TP é obtido após a adição deste reagente ao plasma e a formação do coágulo. O fator tecidual ativa o fator VII, que por sua vez ativa a via extrínseca, formando o complexo protrombinase ancorado pela tromboplastina, que culmina na geração de trombina. Esta atua na molécula do fibrinogênio, formando a rede de fibrina.

A composição e a origem da tromboplastina interferem 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 o sistema RNI (Relação Normalizada Internacional) com o objetivo de padronizar os resultados de TP, conforme será explicado adiante.

Materiais e Reagentes

- ▶ Tubos de ensaio de vidro 12 x 75 mm
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Micropipetas automáticas (100 e 200 µL)
- ▶ Cronômetro
- ▶ Banho-maria 37°C
- ▶ Solução Tampão

Procedimento

Colocar 100 µL de plasma pobre em plaquetas citratado no tubo de vidro e incubar a 37 C por 60 segundos. Adicionar 200 µL de tromboplastina cálcica preaquecida a 37°C no banho-maria.

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

8.1.1 Curva de calibração para a determinação da atividade da protrombina

A cada mudança de lote ou marca do reagente é necessário realizar a curva de calibração. Para o cálculo da atividade enzimática da protrombina são realizadas quatro diluições seriadas de plasma calibrador comercial ou PPN, em tubos plásticos com tampão ou solução fisiológica, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Modelo para construção de curva de calibração do tempo de protrombina

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

Fonte: Autorial própria.

Os tempos de coagulação de cada diluição são relacionados graficamente com as respectivas atividades percentuais, em escala mono-log.

Antes de iniciar a avaliação dos plasmas teste, a curva referência deve ser validada com plasmas conhecidos, normal e patológico. Caso os resultados dos controles internos não sejam satisfatórios, a curva de calibração deverá ser repetida.

8.1.2 Relação Normatizada Internacional – RNI

A RNI foi instituída pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com o intuito de padronizar os resultados de TP, principalmente na monitoração dos pacientes que fazem uso de anticoagulantes antagonistas de vitamina K.

Dependendo da fonte e da preparação da tromboplastina (fosfolípidos e fator tecidual), a sensibilidade do teste pode variar significativamente, causando variabilidade importante nos resultados do TP. Essa variação *in vitro* pode levar os pacientes em uso de anticoagulante a maior risco de sangramento ou de trombose.

Segundo as orientações da OMS, todos os fabricantes de tromboplastina devem comparar o reagente produzido com uma tromboplastina de referência que é extraída de cérebro de coelho. A comparação de sensibilidade da tromboplastina comercial em relação ao padrão primário permite determinar o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) que é utilizado para o cálculo da RNI. Quanto mais próximo de 1,0 for o ISI mais sensível é a tromboplastina.

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

$$\text{RNI} = [\text{TP do paciente} / \text{TP pool}]^{\text{ISI}}$$

Os resultados do TP podem ser reportados em tempo de protrombina, atividade enzimática (%), relação (R) e RNI. Os valores de referência de normalidade para o TP variam de acordo com o reagente utilizado.

O tempo de protrombina alargado pode estar relacionado ao uso de medicamentos, hepatopatias, deficiência de fator VII ou dos fatores da via comum. 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), pode apresentar-se alargado e incoagulável, respectivamente.

O teste da mistura (com *pool* de plasma normal na proporção 1:1) pode ser realizado para identificar se o prolongamento é por deficiência de fator ou pela presença de inibidor. Caso haja correção, deve-se avaliar inicialmente, a atividade do fator VII. Caso os níveis plasmáticos estiverem normais, o próximo passo é avaliar os fatores

II, V ou X de acordo com a clínica do paciente. Caso a deficiência seja única ou múltipla dos fatores V, II, e X, o Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) também pode apresentar tempo de coagulação prolongado, que é corrigido pela mistura a 50% com *pool* de plasmas normais.

Caso após a mistura não haja correção do TP, é sugestivo da presença de inibidor. Isso é válido também para o TTPA no caso de inibidores específicos dos fatores II, V e X. No caso de inibidores inespecíficos, do tipo lúpico, embora o TP seja realizado com reagente contendo fosfolípidos, apenas títulos muito altos desse inibidor prolongam o teste e sem correção após a mistura. Porém, na maioria dos casos de presença de anticoagulante lúpico, o TP não prolonga devido à grande concentração de fosfolípidos, presente no reagente.

8.2 Tempo de tromboplastina parcial ativada – TTPA

O TTPA é o teste de triagem para a avaliação dos fatores das vias intrínseca e comum da coagulação. Deve ter sensibilidade para detectar as deficiências dos fatores VIII, IX, XI e XII, precalicreína e cininogênio de alto peso molecular, além das deficiências moderadas e graves dos fatores II, V, X e fibrinogênio. 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 detectar deficiências de fatores, presença de anticoagulante lúpico e monitorar níveis de heparina não fracionada no plasma.

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.

A tromboplastina parcial (cefalina) utilizada no TTPA é incapaz de ativar a via extrínseca, que requer tromboplastina completa, isto é, o fator tecidual. Por consequência, este teste não é afetado pela deficiência de fator VII. A cefalina, também denominada de substituta de plaqueta, é composta por fosfolípidos de origem animal ou vegetal e ativador com carga negativa (sílica, ácido elágico ou caulim).

A sua sensibilidade depende principalmente da composição de fosfolípidos e menos do ativador utilizado. Porém, na deficiência de pré-caliceína ou de cininogênio de alto peso molecular, o TTPA apresenta-se normal se o reagente for ativado por ácido elágico.

O TTPA é mensurado, inicialmente, pela incubação da cefalina ativada com plasma teste e após 2 a 5 minutos é adicionado o cloreto de cálcio previamente aquecido a 37°C.

Materiais e Reagentes

- ▶ Tubos de ensaio de vidro 12 x 75 mm
- ▶ Micropipeta automática (100 µL)
- ▶ Cefalina contendo um ativador (sílica, caulim, ácido elágico etc.)
- ▶ Cloreto de cálcio 0,025 M
- ▶ Cronômetro
- ▶ Banho-maria a 37°C

Procedimento

100 µl do plasma citratado pobre em plaquetas no tubo de vidro.

100 µl de cefalina ativada.

Incubar a mistura a 37°C por 2-5 minutos (conforme instrução do fabricante da cefalina).

100 µl de solução de cloreto de cálcio 0,025 M preaquecida a 37°C.

Cronometrar o tempo de coagulação.

As provas deverão ser realizadas em duplicata.

Resultados

Os resultados podem ser expressos em tempo de coagulação (segundos) e relação (R) do TTPA do plasma do paciente e TTPA do plasma normal. Os valores de referência do laboratório e do tempo de coagulação do R devem ser calculados utilizando a média geométrica de pelo menos 20 plasmas de doadores normais. Devem ser realizados a cada mudança de lote do reagente do TTPA.

Os pacientes que apresentam sangramento e apenas prolongamento do TTPA a suspeita é de deficiência dos fatores VIII, IX, XI ou presença de inibidor da via intrínseca. Nos casos em que o paciente não apresenta manifestação hemorrágica, o prolongamento do TTPA pode ser interpretado como presença de inibidor inespecífico (anticoagulante lúpico) ou deficiência dos fatores da fase de contato (XII, cininogênio de alto peso molecular e precalicreína).

A investigação da causa do prolongamento do TTPA, assim como do TP, pode ser realizada pelo estudo das misturas (1 parte de plasma teste + 1 parte de PPN 1:1). Caso haja correção de mais de 50% da diferença existente entre os tempos de coagulação do plasma teste e da mistura, sugere-se a deficiência de um fator. Caso contrário, a ausência de correção indica a presença de um inibidor de um dos fatores da coagulação, ou do tipo não específico.

É importante salientar que quando houver a suspeita de inibidor adquirido apenas a sua pesquisa pode não ser efetiva. Deve-se utilizar diretamente o método de quantificação de inibidor (Bethesda ou Bethesda modificado).

Por outro lado, níveis elevados de um fator podem compensar níveis diminuídos de outros. Por exemplo, nível elevado de fator VIII pode levar a um TTPA normal na presença de deficiências leves de fatores IX ou XI. Assim, recomenda-se a determinação dos fatores da via intrínseca sempre que o paciente apresentar história pessoal ou familiar sugestiva de coagulopatia, mesmo que o TTPA seja normal.

8.3 Tempo de Trombina – TT

O TT avalia o tempo em que o fibrinogênio se transforma em fibrina, na presença de uma quantidade padronizada de trombina. O teste é prolongado na presença de heparina, altas concentrações de imunoglobulinas (por exemplo, na macroglobulinemia de Waldenstrom), nas disfibrinogenemias (alteração da função do fibrinogênio), na hipofibrinogenemia, na presença de produtos de degradação de fibrina e fibrinogênio e incoagulável na afibrinogenemia.

A trombina utilizada no TT deve ser de concentração aproximadamente 4 U/ml para a obtenção do tempo normal de aproximadamente 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, caso haja necessidade de diluição da trombina
- ▶ Trombina 4 U/ml (humana ou bovina)
- ▶ Micropipetas automáticas (100 µL e 200 µL)
- ▶ Cronômetro
- ▶ Banho-maria a 37°C

Técnica

Colocar 200 µL do plasma citratado pobre em plaquetas (PPP), no tubo de vidro.

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 em sítio distante do vaso cateterizado.

9 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS COAGULOPATIAS HEREDITÁRIAS

9.1 Diagnóstico laboratorial da doença de von Willebrand

9.1.1 Introdução

A doença de von Willebrand (DVW) é a mais frequente entre as doenças hemorrágicas congênitas descritas. É resultante de alteração quantitativa ou qualitativa do fator von Willebrand (FVW), uma proteína plasmática de adesão essencial na hemostasia primária com três importantes funções. A primeira delas é a de se ligar às estruturas expostas do subendotélio e subsequentemente às plaquetas, por meio 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.

E a outra função está relacionada à hemostasia secundária. O FVW liga-se ao FVIII:C circulante transportando, protegendo-o do fator da inativação.

Por apresentar diferentes expressões fenotípicas com sinais e sintomas de intensidade variável a DVW foi classificada em 1993 com base na mutação genética como alteração quantitativa e qualitativa.

De acordo com a Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia (ISTH) a DVW é classificada em três diferentes tipos (tipos 1, 2 e 3), sendo que o tipo 2 apresenta quatro diferentes subtipos (2A, 2B, 2M e 2N).

Alteração quantitativa: tipo 1 – deficiência parcial do FVW (a mais frequente). Os pacientes com DVW do tipo 1 podem apresentar sangramento de intensidade leve a moderada. O fenótipo heterogêneo deve-se a 3 subtipos: tipo1 "plaqueta normal" (quantidade e função

normal de FVW intraplaquetário) ; tipo 1 "plaqueta baixa" (baixa quantidade do FVW, mas com função normal); tipo 1 "plaqueta discordante" (quantidade normal de FVW com função diminuída).

Alteração quantitativa: tipo 3 – níveis plasmáticos e plaquetários indetectáveis do FVW, o que ocasiona manifestações hemorrágicas graves.

Alteração qualitativa: tipo 2, subdivide-se em – **subtipo 2A** (redução da função dependente de plaquetas, associada à ausência dos multímeros intermediários e de alto peso molecular); **subtipo 2B** (maior afinidade pela GPIb da plaqueta e ausência dos altos pesos moleculares); **subtipo 2M** (redução da função dependente de plaquetas não associada a perda dos multímeros de alto peso molecular); **subtipo 2N – Normandy** (perda da afinidade de ligação ao fator VIII:C).

Além do diagnóstico adequado da DVW a identificação do tipo da doença é muito importante, uma vez que tem implicações terapêuticas.

A confirmação da suspeita da DVW é realizada pelo laboratório por um processo que engloba um painel abrangente de diferentes testes e não por um único específico. A variedade de testes para o diagnóstico e a classificação da doença muitas vezes gera resultados não compatíveis, dada a diferença de sensibilidade de detecção e reprodutibilidade entre os testes.

9.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico de DVW é feito em três etapas: 1 – identificação do paciente com possível DVW, baseado na história clínica, nos sinais e nos sintomas e em testes laboratoriais; 2 – diagnóstico e definição do tipo de doença de von Willebrand; 3 – caracterização do subtipo de doença.

9.1.3 Testes laboratoriais

O painel de triagem para o diagnóstico consiste da determinação do FVW antígeno (FVW:Ag) que avalia a quantidade presente no plasma, a determinação da atividade FVW (Cofator da Ristocetina ou FVW:Atividade) para avaliar a capacidade da proteína em se ligar às plaquetas. Como o FVW transporta o fator VIII:C a atividade do fator coagulante deve ser também determinada.

Testes de Triagem

- ▶ Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)
- ▶ Determinação do FVIII:C
- ▶ Determinação do FVW:Ag
- ▶ Determinação da função do FVW (FVW:RCo; FVW:Ativ; FVW:CB)

É importante salientar que o diagnóstico laboratorial da DVW é realizado com os testes descritos anteriormente, porém a diferenciação dos subtipos 2A, 2B, 2M e 2N requer testes adicionais.

Testes adicionais

- ▶ Agregação plaquetária com Ristocetina em baixas doses (RIPA)
- ▶ Ligação FVW ao fator VIII:C
- ▶ Distribuição dos multímeros do FVW
- ▶ Sequenciamento do gene do FVW

9.1.3.1 Testes de Triagem

9.1.3.1.1 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:C. Nos tipos e subtipos da doença em que apresentam baixos níveis 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, 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. 3.1. 2 Determinação da atividade do fator VIII:C

Usualmente a determinação da atividade do fator VIII:C é realizada pelo método coagulométrico de um estágio, baseado na geração de trombina induzida por adição de cefalina ativada, cloreto de cálcio (TTPa) e plasma deficiente em fator VIII:C. Este método é descrito no Capítulo 9, seção 9.2.1.2.

Interpretação

Na DVW do tipo 3, os níveis plasmáticos do fator VIII:C são muito baixos (1% a 5%) devido à grande redução ou ausência da sua proteína transportadora. Já a DVW do tipo 1, os níveis de fator VIII:C são ligeiramente mais elevados em relação ao FVW:Ag. 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.

9.1.3.1.3 Determinação do FVW:Ag

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 os defeitos quantitativos e qualitativos torna-se praticamente impossível.

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

O método de imunoeletrodifusão foi o primeiro a ser desenvolvido para a quantificação de FVW:Ag, mas devido à baixa reprodutibilidade foi abandonado e substituído pelo método imunológico ELISA, mais sensível, reprodutível e melhor padronizado. É considerado padrão ouro para determinação do FVW:Ag.

Com o avanço da tecnologia, várias marcas de equipamentos foram incrementadas com o sistema de leitura turbidimétrica, possibilitando o uso de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos específicos. Com isso o mercado disponibilizou vários reagentes com base no método de *automated latex immunoassay* (LIA) para a detecção quantitativa do FVW.

De acordo com a literatura, a quantificação do FVW:Ag por LIA apresenta sensibilidade e especificidade comparáveis ao método de ELISA, porém de rápida determinação possibilitando a avaliação de uma única amostra em situação de urgência.

Os laboratórios que não dispõem equipamentos de leitura turbidimétrica têm como alternativa o método ELISA in house (econômico, mas laborioso) ou *kits* comerciais.

Método ELISA in house

Princípio

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

Tampões

- ▶ Tampão Carbonato 0,05 M pH 9,6
- ▶ Carbonato de sódio..... 1,59 g
- ▶ Carbonato de hidrogênio sódico..... 2,93 g
- ▶ Azida sódica..... 0,20 g
- ▶ Água destilada q.s.p..... 1.000 mL
- ▶ Tampão fosfato salino 0,01 M pH 7,2
- ▶ Fosfato de dihidrogênio sódico..... 0,345 g

- ▶ Fosfato de hidrogênio dissódico $12\text{H}_2\text{O}$ 2,680 g
- ▶ Cloreto de sódio..... 8,474 g
- ▶ Água destilada q.s.p..... 1.000 mL
- ▶ PBS Tween 20 ----- 1 mL/L
- ▶ Tampão fosfato citrato 0,1 M pH 5,0
- ▶ Ácido cítrico..... 7,30 g
- ▶ Fosfato de hidrogênio dissódico $12\text{H}_2\text{O}$ 23,87 g
- ▶ Água destilada q.s.p..... 1.000 mL

Solução Substrato

Dissolver 80 mg de 1,2 orto fenilenodiamina dicloro em 15 mL de tampão fosfato citrato e 10 μL de peróxido de hidrogênio 20 volumes.

(Preparar a solução imediatamente antes do uso).

Outros materiais

- ▶ Anticorpo policlonal antifator von Willebrand (anticorpo primário)
- ▶ Anticorpo antifator von Willebrand conjugado com peroxidase
- ▶ Microplacas descartáveis de fundo em U
- ▶ Lavadora e leitora de microplaca
- ▶ Solução de ácido sulfúrico a 10%

Método

1. Adicionar 100 μL de anticorpo primário diluído 1/1.000 em tampão carbonato em cada orifício que será utilizado. Incubar a microplaca por uma hora em temperatura ambiente em câmara úmida.
2. Durante o tempo de incubação diluir o plasma calibrador (1/20; 1/30; 1/40; 1/50; 1/80; 1/160 e 1/320) e o plasma

teste (1/20; 1/40; 1/80 e 1/160 para níveis normais e 1/5 para valores esperados mais baixos) em PBS Tween 1 mL/L.

3. Lavar quatro vezes a microplaca com PBS Tween 0,5 mL/L.
4. Adicionar 100 µL de cada uma das diluições nos orifícios, incubar por uma hora e em seguida lavar a microplaca nas mesmas condições.
5. Adicionar 100 µL do anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído 1/1.000 em PBS Tween 1 mL/L em cada orifício da microplaca.
6. Preparar o substrato e mantê-lo no escuro, envolto em papel de alumínio. Nesse momento adicionar o peróxido de hidrogênio.
7. Ligar a leitora de microplaca.
8. Lavar duas vezes a microplaca com PBS Tween 0,5 mL/L e uma vez com tampão fosfato citrato.
9. Adicionar 100 µL da solução de substrato em cada orifício da microplaca e incubá-la em temperatura ambiente em câmara úmida por aproximadamente seis minutos (até a cor ficar visível na menor diluição da curva padrão).
10. Parar a reação por adição de 100 µL da solução de ácido sulfúrico 10% em cada orifício onde o substrato foi adicionado. Caso seja utilizada a micropipeta multicanal, é conveniente adicionar o substrato em cada fileira da microplaca em intervalo de dez segundos e então adicionar o ácido sulfúrico nas mesmas condições.
11. Leitura da densidade óptica (DO) a 492 nm.

Os resultados são obtidos pela plotagem da DO *versus* diluições em escala duplamente logarítmica ou logarítmica/linear.

A diluição 1/20 pode ser considerada arbitrariamente 100%, a diluição 1/40 considerada 50% e assim por diante.

A correção do valor da amostra teste:

Ex.: Caso o valor real do calibrador seja 85% e a amostra teste calculada a partir da curva de calibração for 7%,

100 ----- 7

85 ----- X X = 6% (valor real da amostra teste)

Interpretação

Vários fatores podem influenciar os níveis plasmáticos do FVW:Ag, tais como: grupo sanguíneo ABO, identidade étnica, idade avançada e gravidez. Indivíduos do grupo sanguíneo O apresentam redução de FVW:Ag de 20%-30% comparado aos indivíduos não O. Também foi descrito que africanos-americanos apresentam níveis mais elevados de FVW:Ag em relação aos caucasianos. Exercícios físicos e estresse podem elevar o FVW:Ag e conseqüentemente mascaram o diagnóstico da DVW, principalmente do tipo I. Portanto, em casos de pacientes que apresentam níveis plasmáticos normais, mas com manifestação hemorrágica mucocutânea e/ou história familiar positiva, a suspeita da doença não deve ser excluída e o teste deve ser repetido em outras ocasiões.

Na DVW do tipo 1 o nível plasmático do FVW:Ag pode estar leve ou moderadamente reduzido, do tipo 3 é indetectável ou muito baixo (<5%). Já os subtipos 2A, 2B e 2M apresentam níveis reduzidos ou normais. No caso da DVW do tipo 2N geralmente o FVW:Ag encontra-se normal.

9.1.3.1.4 Testes de função do fator von Willebrand

O primeiro método desenvolvido para a avaliação da função do FVW foi o cofator de ristocetina (FVW:RCo), em 1975. O teste baseia-se na aglutinação de plaquetas normais, lavadas e formolizadas na presença do antibiótico ristocetina, que promove mudanças de conformação na molécula do FVW para melhor ligar o domínio A1 à GPIb da plaqueta. A aglutinação das plaquetas pode ser detectada com o auxílio de agregômetro de leitura óptica, ou visualmente para os laboratórios que não dispõem do equipamento citado.

As principais limitações do FVW:RCo incluem o tempo, a complexidade de execução e a imprecisão. O coeficiente de variação do teste pode variar de 10% a 40%, tanto com o auxílio de equipamento quanto o método de leitura visual.

Teste cofator de ristocetina (FVW:RCo) – método agregométrico

Princípio

O teste FVW:RCo é realizado na presença de plaquetas humanas normais lavadas e fixadas com formalina. Às plaquetas tratadas são adicionados os plasmas teste ou referência, em várias diluições, e a ristocetina em concentração constante. A reação de aglutinação das plaquetas é detectada por auxílio do agregômetro de sistema óptico.

A maioria dos laboratórios que empregam essa metodologia tem adquirido *kits* comerciais que incluem plaquetas formolizadas e liofilizadas, plasmas calibrador, normal e patológico e a ristocetina. Mas há aqueles que preferem preparar as plaquetas *in house*, técnica que apesar de trabalhosa é de baixo custo. A partir do método de **Mcfarlane**, alguns autores fizeram modificações para assegurar maior tempo de estoque sem comprometimento da função das plaquetas formolizadas.

Preparo das plaquetas formolizadas

Soluções e reagentes

Solução ACD pH 4.5

Citrato de sódio di-hidratado..... 10 g

Ácido cítrico mono-hidratado..... 6 g

Dextrose..... 8 g

H₂O q.s.p. 400 mL

Soluções estoques de Tyrode (se mantidas a 4°C, podem ser conservadas por 2 meses)

Estoque I

NaCl..... 16 g

KCl..... 0,4 g

NaHCO₃ 2 g

NaH₂PO₄..... 0,1 g

H₂O q.s.p. 100 mL

Estoque II

MgCl₂.6H₂O 2,033 g (0.1M)

H₂O q.s.p. 100 mL

Estoque III

CaCl₂.6H₂O 2,191 g (0.1M)

H₂O q.s.p. 100 mL

Tampão Plain Tyrode pH 7.35

Solução estoque I 5 mL

H₂O q.s.p. 100 mL

Solução de albumina bovina (BSA)

Albumina bovina 17,5 g

Solução fisiológica (NaCl 0.9%)..... 100 mL

Estocar a -80°C em alíquotas de 1mL

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

Fosfocreatina (CP) 500 mM

Preparar em Tyrode Plain, aliquotar vários tubos com 500 µl e manter a -20°C.

Mistura de CP + CPK (imediatamente antes do uso)

500 U CPK + 500 µl CP.

Heparina 5.000 U (manter alíquotas a -20°C)

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

H₂O 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

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

Procedimento de lavagem das plaquetas

1. Coletar o sangue em ACD ou utilizar 1 a 2 bolsas de concentrado de plaquetas (dentro do prazo de validade).
2. Centrifugar o concentrado de plaquetas a 1.500 g por um minuto à temperatura ambiente para retirada de hemácias contaminantes da bolsa.
3. Centrifugar o concentrado durante 15 minutos, 1.500 g à temperatura ambiente.
4. Durante o tempo de centrifugação, preparar os tampões de **lavagem I e II**.
5. 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.
6. Centrifugar as plaquetas incubadas no tampão de **lavagem do tipo I** por 15 minutos a 1.500 g a 37°C.
7. 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.

8. Incubar por 10 minutos a 37°C.
9. Enquanto as plaquetas estiverem incubadas, preparar a solução de formaldeído a 2% em **tampão Tyrode Plain**.
10. Adicionar 20 ml de formaldeído 2% após os 10 minutos de incubação das plaquetas ressuspensas **no tampão de lavagem do tipo II**.
11. Incubar a mistura por 60 minutos a 37°C (Obs.: Certificar-se de que o nível de água do banho-maria cobre todo o volume da mistura).
12. Após o tempo de incubação, deixar em geladeira até o dia seguinte.
13. 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.
14. Completar com **Tampão Plain Tyrode** até 50 mL.
15. Centrifugar por 15 minutos a 1.500 g à temperatura ambiente.
16. Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 50 ml de **Tampão Plain Tyrode (PT)**.
17. Centrifugar a 1.500 g por 15 minutos à temperatura ambiente.
18. Desprezar o sobrenadante e ressuspender as plaquetas em 50 mL de **PT**.
19. Centrifugar a 1.500 g por 15 minutos à temperatura ambiente.
20. Desprezar o sobrenadante e ressuspender em 10 ml de **PT** (1 bolsa) ou 20 mL (2 bolsas).
21. Homogeneizar e fazer contagem de plaquetas (2 bolsas

devem conter entre 2,5 milhões a 3 milhões de plaquetas/mm³).

22. Adicionar **azida sódica 10%** na proporção de 10 µL para cada mililitro de suspensão de plaquetas.
23. Essa preparação é estável por dois meses a 4°C e, quando utilizada, deve ser lavada com PT a fim de remover a azida sódica. As plaquetas devem ser diluídas a 280.000/mm³ para a execução do teste.

FvW:RCo método visual

O método apresentado a seguir é uma associação do ensaio microscópico de aglutinação e a técnica de fixação das plaquetas, descrita por Evans e Austen para os laboratórios que não dispõem de equipamento de agregação plaquetária (agregômetro).

Reagentes necessários

- ▶ Ristocetina
- ▶ Albumina bovina
- ▶ Formaldeído 36%
- ▶ EDTA dissódico
- ▶ Cloreto de sódio
- ▶ Fosfato de hidrogênio disódico (Na₂HPO₄)
- ▶ Fosfato de sódio di-hidrogenado di-hidratado (NaH₂PO₄ . 2 H₂O)
- ▶ Citrato trissódico

Quadro 2 – Soluções utilizadas para o preparo das plaquetas fixadas

S1 – Solução de EDTA 0,2%	<ul style="list-style-type: none">– 8,5 g NaCl– 2 g EDTA dissódico– H₂O destilada q.s.p. 1.000 mL <p>Acertar o pH da solução em 6,4</p>
S2 – Solução de fixação das plaquetas	<ul style="list-style-type: none">– 20 mL de solução de formaldeído a 40% ou 22,2 mL de solução de formaldeído a 36%– 0,2 g EDTA disódico– 8,5 g NaCl– 0,4 g Na₂HPO₄– 1,1 g NaH₂PO₄– H₂O destilada q.s.p. 1.000 mL <p>Acertar o pH em 6,4</p>
S3 – Solução de lavagem das plaquetas	<ul style="list-style-type: none">– 1 parte de citrato trisódico 3,8%– 5 partes de solução fisiológica <p>Acertar o pH em 6,4</p>
S4 – Solução de ressuspensão das plaquetas	<p>A mesma solução de lavagem, mas acertar o pH em 7,4</p>
S5 – Solução de estocagem das plaquetas	<ul style="list-style-type: none">– 0,2 g EDTA disódico– 8,5 g NaCl– 0,1 g azida sódica– H₂O destilada q.s.p. 1.000 mL <p>Acertar o pH da solução em 6,4</p>

Fonte: (KITCHEN; MCCRAW; ECHENAGUCIA, 2010).

Procedimento de fixação e lavagem das plaquetas

- ▶ Coletar o sangue em citrato de sódio 0,109 M 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 à temperatura ambiente por uma hora.
- ▶ Misturar nove partes do PRP com uma parte de solução de EDTA (S1) e deixar por dez minutos à temperatura ambiente.
- ▶ Adicionar o mesmo volume contido no tubo de solução de fixação (S2) 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 o tampão de lavagem (S3).
- ▶ Acrescentar solução de lavagem um volume equivalente a 25% do volume inicial do PRP.
- ▶ Manter as 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 o uso imediato. Se não for utilizar imediatamente, ressuspender as plaquetas com solução de estoque e manter a 4°C até o uso.
- ▶ A concentração de ressuspensão das plaquetas deve ser de aproximadamente 800 x 10⁹ plaquetas/L.

Obs.: As plaquetas estocadas a 4°C naturalmente sedimentam. Antes de iniciar o experimento, remover a solução estoque por centrifugação e reconstituir, com igual volume, de solução de suspensão (S4). As plaquetas fixadas e mantidas a 4°C têm estabilidade de aproximadamente dois meses.

Preparo da Ristocetina e Albumina

Solução de Ristocetina

- ▶ 100 mg de ristocetina são diluídos em 3,3 mL de solução fisiológica – solução estoque (concentração final de 30 mg/mL).
- ▶ Solução estoque é congelada imediatamente a -70°C em volumes de 100 μL .
- ▶ Solução de uso: 0,65 mL de solução fisiológica mais 0,1 mL de solução estoque (concentração final de 4 mg/mL) – ristocetina de uso.

Solução de albumina bovina

- ▶ Preparar a solução de ressuspensão da albumina (tampão citrato-salina): uma parte de citrato trissódico 0,11M e cinco partes de solução fisiológica.
- ▶ Preparar a albumina a 6% em tampão citrato-salina (20 mL de tampão citrato-salina e 1,2 g de albumina bovina).

Procedimento do teste

- ▶ Diluir o plasma referência e plasma testes com o 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 na concentração citada anteriormente.
- 0,1 mL de plasma diluído.

Homogeneizar, evitando a formação de bolhas.

- Adicionar 0,1 mL de ristocetina de uso.

Obs.: a concentração final de ristocetina na reação será de 1 mg/mL.

- Acionar o cronômetro e inclinar o tubo de um lado para o outro até a visualização da formação do aglutinado de plaquetas.

Obs.: para a melhor visualização da formação do aglutinado, 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 os tempos for maior que 10%.

Controle: 0,2 mL de plaquetas fixadas + 0,1 mL ristocetina + 0,1 mL tampão albumina deve ter tempo de aglutinação maior que 60 segundos.

Cálculos

Utilizar papel em escala log-log de dois ciclos.

Plotar os tempos de aglutinação das diversas diluições do plasma de calibração versus a concentração.

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

Valor de referência

O valor de referência deve ser estabelecido em cada laboratório, mas geralmente encontra-se entre 50% e 150%.

Interpretação

A atividade do FVW, no tipo 3 da DVW é indetectável 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 de FVW:RCo desproporcionais em relação aos de FVW:Ag (relação < 0.70) são característicos do tipo 2 da doença com exceção do 2N.

A determinação funcional do FVW é um teste muito importante para o diagnóstico de doença de von Willebrand. Porém, a falta de reprodutibilidade e sensibilidade aos baixos níveis plasmáticos nas técnicas agregométrica e manual de cofator de ristocetina, implica diagnósticos não confiáveis com necessidade de inúmeras repetições para a confirmação dos resultados, principalmente nos casos de DVW leve.

Com o intuito de melhorar a acurácia no diagnóstico da DVW, novos testes funcionais foram desenvolvidos.

1. Ligação do FVW ao Colágeno (FVW:CB).
2. Testes de atividade do FVW (FVW:Ativ), baseados nos ensaios imunológicos, ELISA, e Aglutinação com partículas de látex (LIA) utilizando anticorpos monoclonais direcionados ao domínio A1 da molécula de FVW, sítio ligante da Glicoproteína Ib plaquetária.

Nos últimos anos, a automação alcançou grande popularidade na determinação da função do FVW por apresentar boa reprodutibilidade, sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados. Alguns deles substituíram as plaquetas formolizadas por partículas de látex com fragmentos recombinantes de GPIb, dependentes ou não da presença de ristocetina como agente indutor de ligação.

Ligação fator von Willebrand – colágeno (FVW:CB)

Como já foi descrito anteriormente, uma das funções do FVW na hemostasia primária é atuar como mediador entre as plaquetas e o subendotélio.

O teste FVW:CB mede especificamente a ligação do colágeno ao domínio A3 do fator von Willebrand, por técnica de ELISA. Assim como o cofator de ristocetina, os resultados do FVW:CB são dependentes do tamanho dos multímeros do FVW, sendo que os maiores se ligam mais avidamente em relação aos menores.

A alteração da ligação colágeno-FVW associada à mutação no domínio A3 do FVW, independente de tamanho do multímero não altera o FVW:RCo e assim a doença não é detectada, a menos que seja realizado o teste FVW:CB. Alguns autores recomendam a realização

dos dois testes sempre, embora a maioria dos laboratórios realize apenas um deles.

Quanto à sensibilidade em detectar a DVW e discriminar os seus subtipos, de acordo com vários estudos, dependem da fonte de colágeno utilizado no ensaio (colágeno tipo I e a mistura dos tipos I e III).

O FVW:CB é utilizado como teste complementar do FVW:RCo e FVW:Ag não só para a diferenciação dos subtipos 2A e 2M, mas também os subtipos 2A e 2B.

O teste pode ser realizado com o auxílio de *kits* comerciais disponíveis no mercado ou fabricados in house.

A técnica apresentada a seguir foi desenvolvida originalmente por Brown e Bozak e modificada por Favaloro E. J.

Princípio

O FVW do plasma teste liga-se ao colágeno ligado aos orifícios da microplaca de ELISA (previamente sensibilizada).

A segunda reação é a 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.

Atualmente, estão disponíveis algumas marcas de *kits*.

Método

Reagentes e materiais

- ▶ Colágeno tipo I
- ▶ Anticorpo de coelho antifator von Willebrand humano conjugado com peroxidase
- ▶ TRIS básico
- ▶ NaCl

- ▶ Tween 20
- ▶ Albumina
- ▶ Citrato trissódico
- ▶ Na₂HPO₄
- ▶ H₃PO₄
- ▶ H₂O₂ 30%
- ▶ H₂SO₄ 3M
- ▶ Orto-diamino-fenileno (1,2-benzenodiamino) – OPD
- ▶ Microplaca com 96 orifícios
- ▶ Micropipetas de 1.000 µL; 200 µL
- ▶ Micropipeta multicanal 200 µL

Tampão de cobertura (sensibilização da microplaca de ELISA) pH = 7.4

TRIS básico 20 mM

NaCl 100 mM

Albumina 5 %

Tampão de lavagem da placa pH = 7.4

TRIS HCl 20 mM

NaCl 100 mM

Tween 20 0,1 %

Tampão de diluição das amostras e plasma calibrador

Tampão de lavagem 50 mL

Albumina 0,1%

Tampão do substrato OPD pH = 5.5 reajustado com H3PO4

Citrato trissódico 22 mM

Na₂HPO₄ 50 mM

Procedimento

1. Revestir a microplaca com 110 µL da solução de colágeno (25 µg/mL).
2. Incubar por 18 horas à temperatura ambiente.
3. Lavar a placa três vezes com o tampão de lavagem.
4. Revestir a microplaca com 220 µL de tampão de cobertura.
5. Agitar 150 rpm por 1 hora à temperatura ambiente em agitador do tipo Kline.
6. Lavar a microplaca três vezes com o tampão de lavagem.
7. Preparar as amostras e a curva referência.

Curva 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

Caso os níveis do FVW:Ag da amostra teste forem normais, diluir 1:100 e 1:200 com o tampão de diluição.

Caso os níveis do FVW:Ag da amostra teste forem baixos, diluir 1:50 e 1:100 com tampão de diluição .

Caso os níveis do FVW:Ag da amostra teste forem muito baixos, diluir 1:20 e 1:40 com tampão de diluição.

Caso os níveis do FVW:Ag da amostra teste forem muito altos, diluir 1:200 e 1:400 com tampão de diluição

8. Adicionar na microplaca, em duplicata, 100 μ L de cada diluição do plasma referência e das amostras teste.
9. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
10. Lavar a microplaca três vezes com tampão de lavagem.

Preparar o anticorpo secundário

Diluir o anticorpo secundário com o tampão de diluição (1 μ g/mL)

11. Adicionar em todos os orifícios 100 μ L de anticorpo secundário diluído.
12. Incubar a placa por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação (150 rpm).
13. Lavar a microplaca três vezes com tampão de lavagem.

Preparar o substrato cromogênico (no momento do uso)

Solução de OPD – 400 μ g/mL em tampão do substrato cromogênico.

Adicionar 5 μ L de H₂O₂ para cada 12,5 mL de solução de OPD.

14. Adicionar 100 μ L do substrato em todos os poços.
15. Incubar a microplaca ao abrigo de luz por aproximadamente 20 minutos.
16. Parar a reação com adição de 50 μ l de H₂SO₄ 3M em todos os poços.

17. Após 15 minutos fazer a leitura colorimétrica a 492 nm.
18. Calcular a porcentagem 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 fator von Willebrand apresentam a relação 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 menor que 0.7. A desproporcionalidade deve-se à ausência dos multímeros de alto peso molecular.

O subtipo 2M (presença de todos os multímeros) apresenta a relação FVW:CB/FVW:Ag proporcional, e desproporcionalidade na relação FVW:RCo/FVW:Ag, uma vez que o defeito se encontra no domínio A1.

9.1.3.2 Testes especiais

9.1.3.2.1 Aglutinação plaquetária com ristocetina (ristocetin–induced platelet agglutination ou RIPA)

O ensaio é tipicamente a aglutinação plaquetária utilizando amostra de sangue fresca do paciente com ristocetina em duas ou mais concentrações (0,6 e 1,2 mg/mL). Pode ser realizado em sangue total (sistema de impedância) ou por sistema óptico com plasma rico em plaquetas (PRP).

O teste RIPA avalia a interação do FVW e do receptor Ib das plaquetas e a sensibilidade é dependente do nível plasmático e função do FVW. Pacientes com DVW do tipo 3 as plaquetas não aglutinam mesmo em altas concentrações (acima de 2,0 mg/mL), devido à ausência do FVW, enquanto que os pacientes com DVW do tipo 1 podem apresentar aglutinação normal ou diminuída dependendo dos níveis plasmáticos do FVW.

O teste RIPA é pouco sensível a deficiências quantitativas, leves e moderadas do FVW. Pacientes com níveis plasmáticos acima de 15% apresentam aglutinação normal. Plaquetas de pacientes com tipo 1 grave (<15% de FVW:Ag) e 2A tendem a aglutinar em concentrações de ristocetina acima de 1,2 mg/mL. Contrariamente, indivíduos com o tipo 2B e pseudo von Willebrand apresentam resposta de aglutinação aumentada em concentrações abaixo de 0,6 mg/mL de ristocetina.

A avaliação da resposta de aglutinação plaquetária na presença de ristocetina tem sido motivo de dúvidas. O resultado é baseado na velocidade de aglutinação que ocorre na primeira onda (*slope*) ou na amplitude máxima. A agregação secundária (segunda onda de agregação) é independente da resposta à ristocetina e não deve ser valorizada.

Cada laboratório deve estabelecer os próprios valores de referência de amplitude de agregação para as duas concentrações de ristocetina utilizadas (1,2 mg/mL e 0,6 mg/mL).

9.1.3.3 Diferenciação laboratorial entre DVW 2B e pseudo von Willebrand

As doenças de von Willebrand do subtipo 2B e pseudo von Willebrand ou von Willebrand plaquetário são hereditárias com padrões fenotípicos e sintomas clínicos semelhantes, mas com diferentes etiologias.

A DVW do subtipo 2B está associada a mutações que levam a um ganho de função do fator von Willebrand. Essas mutações aumentam a ligação do FVW ao receptor plaquetário Ib resultando na interação espontânea do FVW e plaquetas, na circulação, o que não ocorre com FVW normal. Já a doença pseudo von Willebrand é caracterizada por 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 ou por teste de agregação plaquetária ou biologia molecular.

Teste de agregação plaquetária com 0,5 mg/mL de ristocetina

1. Constatar se as plaquetas do paciente em investigação não apresentam agregação plaquetária espontânea. Caso positivo, as duas patologias podem ser descartadas.
2. Centrifugar o sangue do paciente e de um indivíduo normal a 120 g por 10 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).
3. O restante do sangue, tanto do paciente quanto do indivíduo normal, é centrifugado a 1.200 g por 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP).
4. Transferir o PRP com auxílio de pipeta plástica para dois tubos cônicos distintos e ajustar o pH a 6.4 com ácido cítrico 0.2M.
5. Retirar 1 mL de PRP, tanto do paciente quanto do indivíduo normal, lavar por centrifugação a 1.200 g (3 vezes) com tampão Tyrode pH 6.4 (8,0 g NaCl; 0,2 gKCl; 0,065 g; NaH2PO4.2H2O; 0,415 g MaCl2. 6H2O; 1,0 g NaHCO3).
6. 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 do plasma do paciente.
7. Repetir a agregação plaquetária com ristocetina na concentração final de 0,5 mg/mL tanto das plaquetas ressuspensas no plasma do indivíduo normal quanto das plaquetas do indivíduo normal ressuspensas no plasma do paciente.

Interpretação

Quadro 3 – Agregação plaquetária com ristocetina na concentração final de 0,5 mg/mL

PRP paciente + PPP paciente	Plaquetas lavadas do pa- ciente + PPP do indivíduo normal	Plaquetas lavadas do indivíduo normal + PPP do paciente
POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO = DVW 2B
POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO = PSEUDO DVW

Fonte: Laboratório de Hemostasia USP.

9.1.3.4 Ligação fator von Willebrand ao fator VIII:C (FVW:VIII:B)

Trata-se de um teste importante para diferenciar a DVW tipo 2N de hemofilia A leve ou moderada.

A intensidade do defeito de ligação do fator VIII:C ao FVW é dependente da mutação, que até o momento várias foram identificadas nos domínios D' e D3.

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

Avaliação da ligação do fator VIII:C ao FVW por método imunológico e cromogênico

Princípio

O teste é realizado em duas microplacas distintas. Na primeira é determinado o FVW:Ag e na segunda é avaliada a ligação VIII:C-FVW.

O teste de ligação VIII:C-FVW inicia-se 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 é determinada por método cromogênico.

Os níveis de fator VIII recombinante que foi ligado ao FVW é relacionado com a quantidade de FVW:Ag do paciente.

Técnica

1 – Preparo das microplacas para as reações

Dia 1

- ▶ Revestir duas microplacas (1 e 2) de ELISA com anticorpo anti-von Willebrand (7 a 10 µg/mL).
- ▶ Pipetar 125 µL do anticorpo em cada orifício, na microplaca 2 deixar as duas últimas colunas vazias.
- ▶ Manter a microplaca em geladeira até o dia seguinte.

Dia 2

- ▶ Lavar a microplaca três vezes com o tampão de lavagem (1), que é o utilizado na determinação do fator von Willebrand:Ag.
- ▶ Pipetar 250 µL do tampão de cobertura, o que é utilizado na determinação do fator von Willebrand:Ag adicionado de 3% de albumina bovina.
- ▶ Incubar 3 horas à temperatura ambiente.
- ▶ Lavar a microplaca três 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 fator von Willebrand:Ag 1/25; 1/50; 1/100; 1/200; 1/400; 1/800; 1/1.600 o que corresponde a 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,15% e 1,07%, respectivamente.

2 – Determinação de FVW:Ag e ligação FVIII:C – FVW

Dia 3

- ▶ Na placa 1 fazer a determinação de fator von Willebrand:Ag.
- ▶ Na placa 2 adicionar 100 µL de CaCl₂ 0,35M.
- ▶ Incubar à temperatura ambiente por 60 minutos sob agitação de 100 rpm.
- ▶ Lavar a microplaca com tampão de lavagem (1) seis vezes.
- ▶ Adicionar 125 µL de anticorpo de coelho antimouse na concentração de 0,43 mg/mL de proteína diluído em tampão de diluição de anticorpo utilizado na determinação de fator von Willebrand:Ag.
- ▶ Incubar a microplaca sob agitação a 37°C por 30 minutos.
- ▶ Lavar a microplaca com o tampão de lavagem (1) três vezes.
- ▶ Adicionar 100 µL de fator VIII recombinante na 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 37°C.
- ▶ Lavar a microplaca três 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 sequência de determinação deve ser seguida de acordo com o *kit* comercial cromogênico de determinação do fator VIII:C.

Interpretação

Nos pacientes com o tipo 2N com homozigose ou heterozigose combinada (um alelo do tipo 2N e outro do tipo 1 ou null), o fator VIII:C não se liga normalmente ao FVW. Portanto os níveis plasmáticos estão diminuídos em relação ao FVW:Ag.

9.1.3.5 Padrão multimérico do fator von Willebrand

O FVW é composto por subunidades diméricas ligadas entre si por pontes de sulfeto formando complexos multiméricos de baixo, intermediário e alto peso molecular variando de 8×10^5 a 15×10^6 daltons.

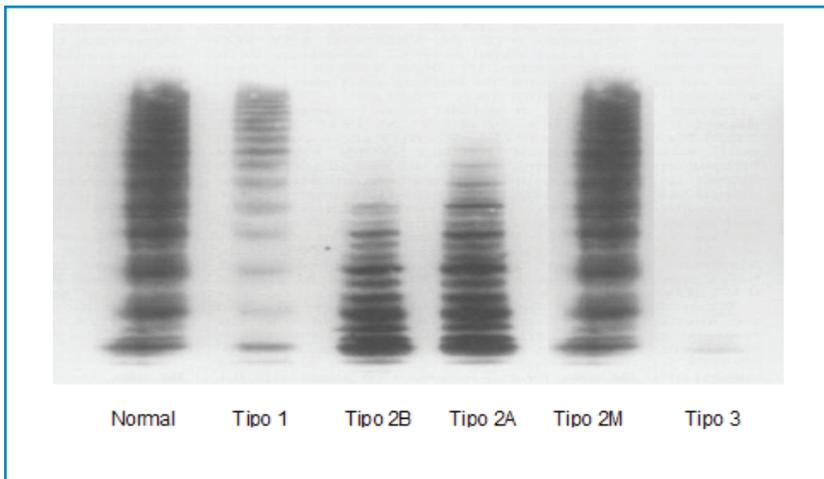
A separação eletroforética dos multímeros do FVW em gel de agarose e a visualização permitem distinguir os diferentes subtipos da doença, principalmente os subtipos 2A, 2B e 2M.

Princípio

Inicialmente os multímeros do FVW são separados por eletroforese utilizando gel de agarose de baixa (1%) ou alta resolução na presença de sulfato de dodecil sódico (SDS), por tamanho molecular. Após a

separação, as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose onde será realizada a reação denominada western blotting. Primeiramente é adicionado o anticorpo primário, policlonal anti-FVW e posteriormente o anticorpo secundário anti-FVW conjugado com peroxidase ou fosfatase alcalina. No caso do anticorpo conjugado com peroxidase a visualização dos multímeros pode ser realizada com a adição de solução de luminol seguida de autorradiografia (Figura 3).

Figura 3 – Revelação dos multímeros do fator von Willebrand



Fonte: Laboratório de Hemostasia USP.

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

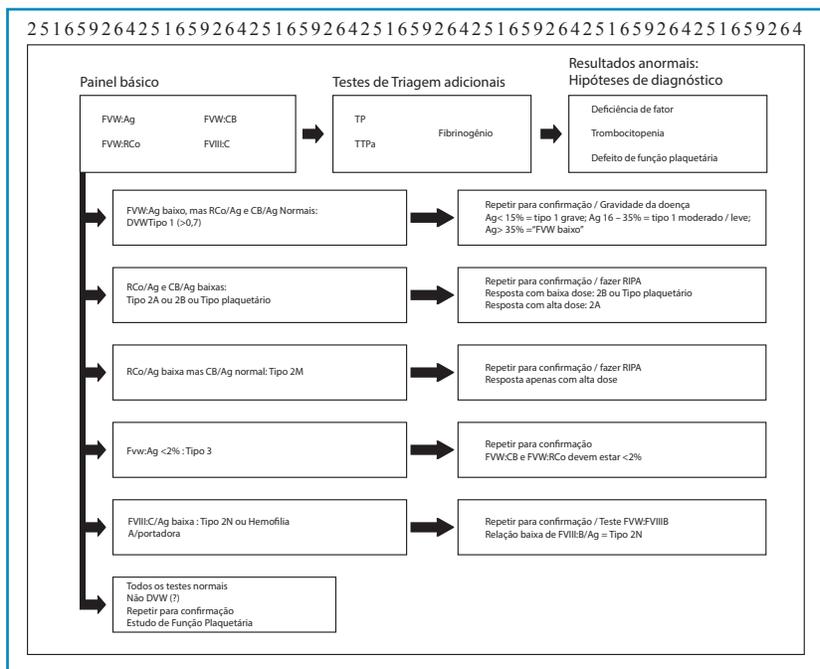
Tipo 2 – ausência dos multímeros de alto peso molecular, exceto no subtipo 2M, que apresenta padrão multimérico normal.

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

9.1.4 Interpretação dos resultados

Para a interpretação dos resultados obtidos tanto dos testes confirmatórios como especiais para a tipagem e subtipagem da DVW, foi proposto o seguinte fluxograma:

Figura 4 – Fluxograma proposto para o diagnóstico da doença de von Willebrand



Fonte: (FAVALORO, 2011).

FwW:Ag – fator von Willebrand antigênio; FwW:RCo – cofator de ristocetina; FvIII:C – fator VIII coagulante; FwW:RCo/FwW:Ag – relação da atividade do fator de ristocetina e fator von Willebrand antigênio; FvIII:B – teste de ligação do fator VIII:C ao fator von Willebrand; FwW:CB – ligação do fator von Willebrand ao colágeno; RIPA – agregação plaquetária com ristocetina.

9.1.5 Considerações

Vários fatores podem alterar os níveis plasmáticos do FwW e, conseqüentemente, dificultar o diagnóstico da doença. Um deles é o grupo sanguíneo ABO. Indivíduos com tipo sanguíneo O apresentam níveis plasmáticos de FwW:Ag, Fator VIII:C e FwW:RCo reduzidos em

aproximadamente 25% em relação aos dos outros tipos sanguíneos e, muitas vezes, sendo equivocadamente diagnosticados como DVW do tipo 1. O maior determinante 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 os 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 a coleta e o processamento do sangue, podem comprometer significativamente os resultados.

9.1.6 Recomendações para coleta e processamento da amostra

1. **Condições de flebotomia:** a menos traumática e com garroteamento por até um minuto, limita a liberação de fator tecidual no sítio de punção e, conseqüentemente, a ativação dos fatores de coagulação e liberação de FVW.
2. **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.
3. **Processamento da amostra:** para prevenir a crioprecipitação do FVW e outras proteínas, a amostra de sangue deve ser transportada ao laboratório à temperatura ambiente (TA). Após a centrifugação da amostra em TA o plasma pode permanecer a TA por até 2 horas, se os testes forem realizados no mesmo dia da coleta. Caso contrário, o plasma deve ser congelado imediatamente em alíquotas contendo pouco volume (0,5 ml) e mantidas abaixo de -40°C .
4. **Amostras controle:** utilizadas como sinalizadoras de possíveis problemas tanto na etapa pré quanto na analítica devem ser

coletadas, transportadas, processadas e estocadas nas mesmas condições da amostra teste.

9.1.7 Variabilidade dos testes laboratoriais

O teste FVW:RCo apresenta um coeficiente de variação (CV) de 20% a 30% e é ainda maior quando a atividade do FVW for 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 a erros pré e analíticos, podem dificultar o diagnóstico da DVW assim como na sua tipagem e subtipagem (exemplo tipo 1 e tipo 2 utilizando a relação FVW:RCo / FVW:Ag).

9.2 Hemofilia

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária caracterizada pela deficiência das proteínas conhecidas como fatores VIII (hemofilia A) e IX (hemofilia B). A hemofilia A que é a mais prevalente e representa aproximadamente 75% dos casos, enquanto a hemofilia B representa 25% dos casos. Os genes que codificam os fatores VIII e IX estão localizados no cromossomo X, e desta forma a doença afeta quase exclusivamente indivíduos do sexo masculino, enquanto a mulher portadora é habitualmente assintomática. A apresentação clínica é semelhante para as duas deficiências, caracterizada por sangramento intra-articular (hemartrose), hemorragia muscular, em outros tecidos ou cavidades e sistema nervoso central. De acordo com os níveis circulantes dos fatores VIII ou IX, se <1%, 1% a 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 desses anticorpos, conhecidos como inibidores, dificulta a indução da hemostasia terapêutica com concentrado de fatores prejudicando o tratamento do paciente. A prevalência de inibidores varia entre 1% e 5% nos pacientes com hemofilia B e entre 10% e 30% nos 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 quantificação dos inibidores deve ser realizada em todos os pacientes com diagnóstico de hemofilia, antes e depois de procedimentos cirúrgicos e com periodicidade mínima a cada seis meses caso o paciente esteja em tratamento com reposição de concentrado de fator ou pelo menos uma vez ao ano.

9.2.1 Diagnóstico e acompanhamento laboratorial das hemofilias

O diagnóstico laboratorial das hemofilias A e B inicia-se com os testes de triagem TP e TTPA e determinação de FVIII: C e/ou FIX: C. Após a identificação do tipo da hemofilia é importante a investigação do desenvolvimento de inibidor neutralizante da função coagulante do fator, com o auxílio de método quantitativo de inibidor. Estas determinações seguem características específicas, as quais serão abordadas e detalhadas nos tópicos seguintes.

9.2.1.1 Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado – TTPA

Como já descrito no Capítulo 8, item 8.2, a determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (TTPA) consiste na recalcificação do plasma na presença de fosfolípido e de um ativador do sistema de contato. Dessa forma, é um teste de triagem universalmente aceito para identificar anomalias no sistema intrínseco e comum da coagulação e, conseqüentemente, terá um resultado anormal para os pacientes portadores de hemofilias A e B, enquanto que o teste Tempo de Protrombina (TP), que avalia a via extrínseca, será normal. Detalhes sobre os testes de triagem já foram discutidos em capítulo anterior, no entanto, é importante salientar que o teste de TTPA apresenta algumas limitações em relação aos níveis plasmáticos dos fatores de via intrínseca. Um componente, importante para a realização do teste é o reagente cefalina, que devido à grande heterogeneidade em sua composição, pode apresentar sensibilidade diferenciada de acordo com o fabricante e gerar resultados conflitantes e até mesmo ser insensível à deficiência de fatores da via intrínseca. A cefalina

também é o reagente utilizado na determinação do FVIII e FIX, e da mesma forma pode interferir na determinação dos níveis plasmáticos dos fatores, como já demonstrado por alguns pesquisadores (VERBRURGE et al., 2008). Dessa forma, é importante a validação dos reagentes utilizados nos testes de triagem, no caso o TTPA, quanto à sensibilidade e à especificidade da cefalina.

9.2.1.2 Determinação da atividade coagulante dos fatores

VIII e IX

A determinação dos níveis dos fatores permite o diagnóstico adequado das hemofilias e a classificação da doença, além de orientar o acompanhamento do paciente ao longo do tratamento.

Para a determinação destes fatores da coagulação, dois métodos são disponíveis: o método de um estágio, conhecido como coagulométrico, e o método de dois estágios, atualmente substituído pelo método cromogênico. De acordo com as recomendações do *International Standard of Thromboses and Haemostasis* (ISTH) o método cromogênico é o mais recomendado para o diagnóstico da hemofilia A, devido a sua melhor especificidade quando comparado ao método de um estágio. No entanto, o método apresenta algumas limitações quanto à reprodutibilidade para a determinação do FIX:C, na hemofilia B. Em geral, o princípio do método cromogênico é baseado em dois estágios, no primeiro ocorre a geração do complexo protrombinase e, no segundo, o fator IX que foi ativado será mensurado por um substrato cromogênico. Este método não depende de substrato deficiente de fator, eliminando assim, possíveis interferências de fator VIII ou IX residual do reagente. Além disso, o teste não é influenciado pela presença de anticorpos inespecíficos (anticoagulante lúpico) que reduzem os níveis plasmáticos destes fatores, *in vitro*. Outra situação observada ao longo dos últimos anos é que em aproximadamente 30% dos pacientes com hemofilia A leve, causada por mutação *missense* (mutação de ponto com troca de aminoácido), apresentam discrepância de resultado quando estes dois métodos são comparados. Normalmente, a atividade do fator determinada pelo método cromogênico é menor quando comparada ao de um estágio. Porém, o método de um estágio, baseado no

princípio coagulométrico, é mais amplamente utilizado devido ao seu menor custo. Neste método, o plasma teste é misturado com um plasma deficiente da proteína de interesse, FVIII ou FIX, e em seguida é realizado o TTPA, conforme descrito anteriormente. O valor do TTPA reflete o quanto o plasma teste ou padrão fornece de fator para corrigir o plasma deficiente. Vários trabalhos descritos na literatura evidenciam uma variabilidade nos resultados da atividade destes fatores devido ao grande número de diferentes procedências, com diferentes composições, dos reagentes cefalina e plasma deficientes. Essa heterogeneidade de composição pode acarretar em resultados não assertivos, levando ao tratamento inadequado do paciente. Dessa forma, com intuito de minimizar as interferências inerentes à determinação de FVIII ou FIX pelo método de um estágio, algumas recomendações serão discutidas a seguir:

(1) Avaliação de paralelismo de curvas: Um prerequisite importante para este ensaio é a avaliação do paralelismo entre a curva de calibração e as diferentes diluições do plasma do paciente. O não paralelismo pode indicar a presença de um inibidor ou a presença de alguma interferência na fase pré-analítica. Neste caso, o resultado desta análise não deve ser considerado, e uma nova amostra deve ser solicitada. Caso o quadro persista, é importante a investigação da presença de inibidor. Para realização do paralelismo de curvas, a determinação dos fatores de coagulação de cada paciente deve ser realizada em três diluições diferentes. Dessa forma, após realizar a curva de calibração habitual, que apresenta em média oito pontos, cada amostra deverá ser diluída de acordo com os três primeiros pontos da curva de calibração. Exemplo: se a curva de calibração inicia com a diluição 1/10, as diluições da amostra deverão ser 1/10, 1/20 e 1/40. Em um papel mono-log deve-se traçar os três primeiros pontos da curva de calibração 1/10, 1/20 e 1/40 em conjunto os mesmos três primeiros pontos de cada paciente, conforme a Figura 5.

(2) Plasma de referência utilizado como calibrador: A atividade do FVIII:C ou FIX:C é comparada à curva de calibração realizada com um plasma de referência, também denominado plasma calibrador. Este tem como objetivo apresentar a correlação entre o tempo de coagulação e a atividade plasmática do fator de coagulação. A atividade de FVIII:C ou FIX:C no plasma é expressa em UI/dL, sendo

que 100 UI é definido como a atividade que está presente em 1 dL de pool de plasma normal. Dessa forma, se um calibrador comercial com concentração definida não é utilizado, a estimativa deste valor pode alterar o verdadeiro nível de fator e conseqüentemente sub ou superestimar o resultado da atividade do fator do paciente. Os guidelines internacionais recomendam que o plasma de referência, calibrador comercial seja calibrado a partir do padrão internacional de fator proveniente da Organização Mundial da Saúde (OMS), obtido por meio do National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

(3) Plasma deficiente de fator FVIII:C ou FIX:C: Uma característica importante da determinação dos fatores de coagulação é a qualidade do plasma deficiente utilizado. No passado, plasmas de pacientes com hemofilia grave eram utilizados para este fim, no entanto, com os avanços tecnológicos, atualmente o fator pode ser removido do plasma por procedimentos químicos ou imunológicos. Porém, a forma de produção pode comprometer a sensibilidade e a especificidade do reagente. A qualidade do plasma deficiente em fator VIII e IX depende das seguintes características: 1) ausência total ou atividade menor que 1 UI/dL de fator. Alguns estudos mostram que uma das dificuldades em discriminar a hemofilia A ou B grave (FVIII ou FIX < 1 UI/dL) é devido ao processo inábil de retirada imunológica do fator VIII ou IX, resultando em fator residual igual ou maior que 1%. Por outro lado, a quantificação de inibidor de fator VIII, discutida neste capítulo, com plasma deficiente em fator VIII, de retirada imunológica pode beneficiar a análise por conter quantidade suficiente de FVW (carreador natural e estabilizador do fator VIII coagulante) que está presente no pool de plasma normal (fonte de FVIII da reação). 2) o plasma deficiente deve conter todos os outros fatores da coagulação, com exceção do "deficiente" em concentração normal próxima a 100%, a falta de um ou outro fator pode acarretar em não paralelismo com a curva de calibração e erro no resultado

Método manual para a determinação dos fatores VIII:C e IX:C

Neste manual optou-se em descrever a técnica manual destas determinações por ser o padrão ouro, além disso, pode auxiliar no entendimento do princípio do método, assim como os processos de

validação de reagente e equipamentos realizados no laboratório. 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 µL e 1.000 µL
- ▶ Cronômetro

Reagentes:

- ▶ Plasma deficiente em fator VIII ou IX
- ▶ Plasma calibrador
- ▶ Cefalina (ativador sílica de preferência)
- ▶ Cloreto de cálcio 0,025 M
- ▶ Tampão imidazol pH 7,4 ou tampão Veronal ou NaCl 0,9% tamponado (o tampão utilizado para preparar a curva de calibração deverá ser o mesmo para preparar a diluição do plasma dos pacientes)

Curva de calibração:

Geralmente, a curva de calibração é realizada para cada lote de reagente (reagentes de TTPA e plasma deficiente). Porém, é importante observar o coeficiente de variação dos controles de qualidade internos (normal e patológico), bem como o valor esperado. Caso haja variações constantes acima ou abaixo de 1SD (desvio padrão) da média, uma nova curva deverá ser realizada.

Procedimento do teste:

Diluir o plasma calibrador com tampão de escolha. A diluição inicial é específica para cada fabricante do reagente de fator VIII. Sendo assim, antes de se proceder a diluição, é importante consultar as recomendações do fabricante. Vide o exemplo na Tabela 3 para uma diluição inicial 1:5 recomendada por um fabricante específico.

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

Tabela 3 – Diluições do calibrador para realização da curva de calibração do FVIII

Tubos	1	2	3	4	5	6	7
Tampão (mL)	0,8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Calibrador (mL)	0,2	-	-	-	-	-	-
Misture e transfira (mL)	0,5*	0,5*	0,5*	0,5*	0,5*	0,5*	0,5**
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: Autoria própria.

*Misture e transfira para o tubo posterior.

**Desprezar.

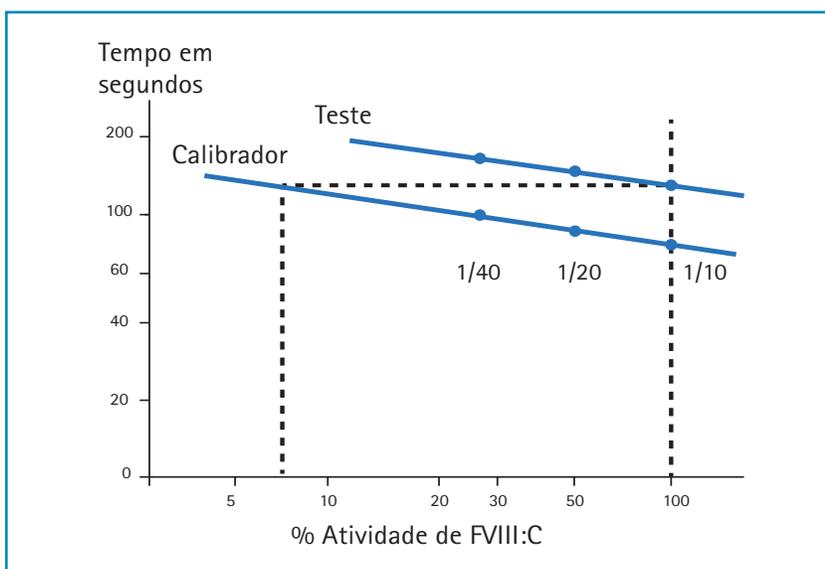
Reação

- ▶ 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 preaquecido a 37°C e disparar simultaneamente o cronômetro.
- ▶ Parar o cronômetro ao primeiro sinal de formação da fibrina.

A curva de calibração deverá ser realizada em duplicata. Colocar o valor encontrado (média da duplicata) no gráfico, em papel mono-log, com as percentagens das diluições na abscissa e o tempo em segundos na ordenada. Marcar os pontos, traçando uma reta. Em equipamentos semi ou totalmente automatizados, é importante observar o coeficiente de regressão linear que deverá estar entre o intervalo 0.970 a 1.0. Para a amostra teste, conforme mencionado anteriormente, realizar as três primeiras diluições também utilizadas na curva de calibração (1/5, 1/10, 1/20) e proceder conforme os passos anteriores.

Avaliação dos resultados: o valor obtido das três diluições da amostra teste deverá ser interpolado na curva de calibração obtida. Um paralelismo entre os pontos do calibrador e do paciente deverá ser encontrado. Ao término da avaliação de paralelismo, quando esta for adequada, a média das triplicatas pode ser utilizada para calcular a concentração plasmática da proteína. Então, deve-se calcular a média dos resultados em percentagem, respeitando um coeficiente de variação de 5% entre as diluições. A Figura 5 ilustra um exemplo de curva de calibração e o paralelismo.

Figura 5 – Curva de calibração-paralelismo na determinação de fator específico



Fonte: Autoria própria.

9.2.1.3 Quantificação de inibidor de fator de coagulação

Para determinar se o paciente desenvolveu um anticorpo de função inibitória do fator de coagulação, que seja de baixa ou alta resposta, é importante a quantificação de inibidor, no mínimo a cada seis 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 quantificação de inibidores é essencial para que haja o acompanhamento e o tratamento de pacientes com hemofilia.

Para aumentar a especificidade de detecção do inibidor é recomendado que o plasma teste citratado seja incubado por 30 minutos à temperatura de 56°C. O aquecimento da amostra propicia o rompimento de qualquer tipo de ligação do anticorpo presente no plasma além de degradar todos os fatores presentes, inclusive fator VIII ou IX residuais. Este procedimento possibilita que a amostra do paciente seja analisada mesmo em vigência de tratamento com concentrado de fator. Em casos de envio de amostra para outros centros ou laboratórios para a quantificação de inibidor, a amostra de plasma do paciente poderá ser enviada a temperatura ambiente sem que a função do anticorpo a ser analisado seja afetada. Dessa forma, não é necessário que o plasma seja congelado a baixas temperaturas, conforme as recomendações para avaliação das proteínas da coagulação, como por exemplo, os fatores da coagulação.

Quantificação de inibidor por método Bethesda modificado

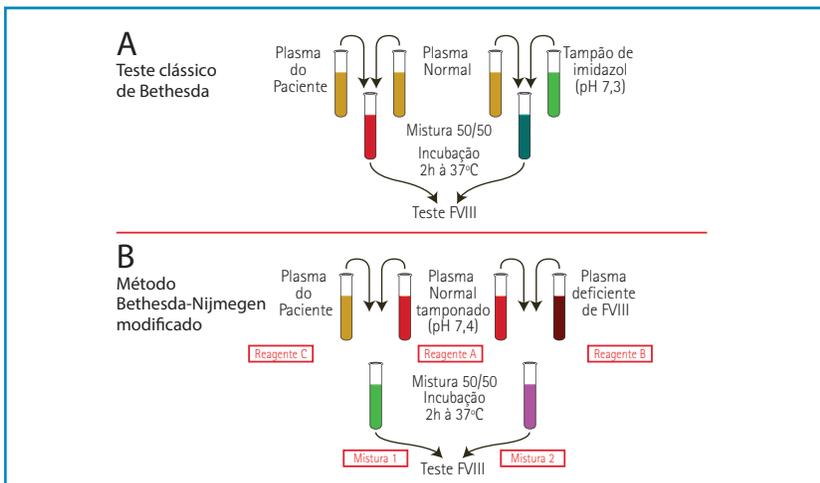
Vários métodos são descritos para a quantificação de inibidor em hemofilia. O método de Bethesda, inicialmente descrito por Carol Kasper em 1975 e modificado em 1995 por Verbruggen, é o mais utilizado e recomendado pela Federação Mundial de Hemofilia, método Nijmegen Bethesda.

Na versão original ou o método clássico de Bethesda envolve a mistura da amostra do paciente com um mesmo volume de pool de plasmas normais (plasma com nível de fator VIII conhecido). Como a maior parte dos anticorpos associados à hemofilia A é tempo e temperatura dependente, a mistura é incubada a 37°C por 2 horas para que haja a neutralização do fator VIII do pool de plasmas normais pelo anticorpo presente na amostra do paciente. Quanto maior é o título do inibidor menor será o fator VIII residual da mistura.

Devido à perda de fator VIII durante o longo tempo de incubação e, por isso, resultando alta porcentagem de casos falsamente positivos de inibidor, Verbruggen fez algumas modificações do método Bethesda clássico, conferindo ao método maior especificidade e sensibilidade aos baixos títulos de inibidor.

1. O tamponamento da fonte de fator VIII, o *pool* de plasmas normais para a manutenção e a estabilização do fator VIII durante o período de a incubação a 37°C.
2. O controle da reação para o cálculo do fator VIII residual passou a ser a mistura do *pool* de plasmas normais, tamponado e plasma deficiente em de fator VIII na proporção de 1:1.
3. A diluição da amostra do paciente para a titulação do anticorpo pode ser realizada com plasma deficiente em fator VIII ou com o mesmo tampão utilizado para a realização da curva de calibração e diluição das amostras na determinação do fator VIII.

Figura 6 – Ilustração esquemática dos testes de Bethesda (A) e Bethesda modificado (B)



Fonte: (BRASIL, 2008).

Método Bethesda-Nijmegen modificado

Reagentes:

- ▶ Reagente substrato deficiente de FVIII ou FIX. Para testar FVIII, dar preferência a reagentes que preservam a quantidade de FVW.

- ▶ Cefalina, o mesmo reagente para TTPA.
- ▶ Fonte externa e padronizada de FVIII (1) pool de plasmas normais tamponado, cujo preparo é descrito no Capítulo 7, ou (2) Calibrador comercial, plasma utilizado para a realização da curva de calibração na determinação de fatores da coagulação.
- ▶ Tampão utilizado na curva de calibração e na diluição do plasma dos pacientes (Tampão imidazol pH 7,4 ou tampão Veronal ou NaCl 0,9% tamponado).

Teste para pacientes que não apresentam expectativas da presença de inibidor:

(a) Adicionar 200 µl de plasma do paciente a 200 µl de pool de plasmas normais tamponado ou plasma calibrador para confirmação da negatividade, quando necessário.

(b) Controle: adicionar 200 µl de plasma deficiente de FVIII e 200 µl de pool de plasmas normais tamponado ou plasma calibrador.

(c) Incubar a 37°C por 2 horas e posteriormente determinar a atividade de FVIII:C de todas as diluições e do controle.

Teste para pacientes que apresentam expectativas da presença de inibidor:

(a) A amostra do paciente deve ser diluída várias vezes antes da mistura com o pool de plasmas normais, tamponado ou reagente plasma calibrador. Ex.: Preparar diluições do plasma do paciente (Plasma puro; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 etc.), este é um dos passos mais importantes da técnica e que pode ocasionar grande variabilidade no resultado final. Recomenda-se a realização de diluições independentes para assegurar maior precisão na determinação do FVIII de cada diluição. Quanto maior a quantidade de diluição maior é a possibilidade de chegar ao resultado final quando há a presença de inibidor, poucas diluições podem não ser suficientes para o cálculo final.

(b) Adicionar 200 µl de plasma do paciente não diluído e suas respectivas diluições, a 200 µl de pool de plasmas normais, tamponado ou plasma calibrador.

(c) Controle: adicionar 200 µl de reagente deficiente de FVIII e 200 µl de pool de plasmas normais, tamponado ou plasma calibrador; incubar a 37°C por 2 horas e posteriormente determinar a atividade do FVIII:C da amostra não diluída (b) e todas as diluições (a), bem como do controle (c). A determinação de FVIII deverá ser realizada logo após as 2 horas de incubação. Caso não seja possível, as amostras deverão ser mantidas em temperatura de 2°C a 8°C para posterior determinação de FVIII.

Recomendações: A quantidade de FVIII utilizada como fonte para o anticorpo deverá ser monitorada em todas as rotinas de determinação de quantificação de inibidor de FVIII. Esta é uma etapa importante para minimizar os resultados sub e superestimados. O intervalo de atividade de FVIII ou FIX esperado no plasma tamponado é de 95% a 110 %. Valores superiores ou inferiores podem levar a resultados falsamente negativos ou positivos. Para o controle, os valores esperados após incubação devem estar entre 47,5% a 55%, devido à diluição 1/2 com o plasma deficiente em fator VIII. Valores fora desta faixa podem comprometer o resultado final.

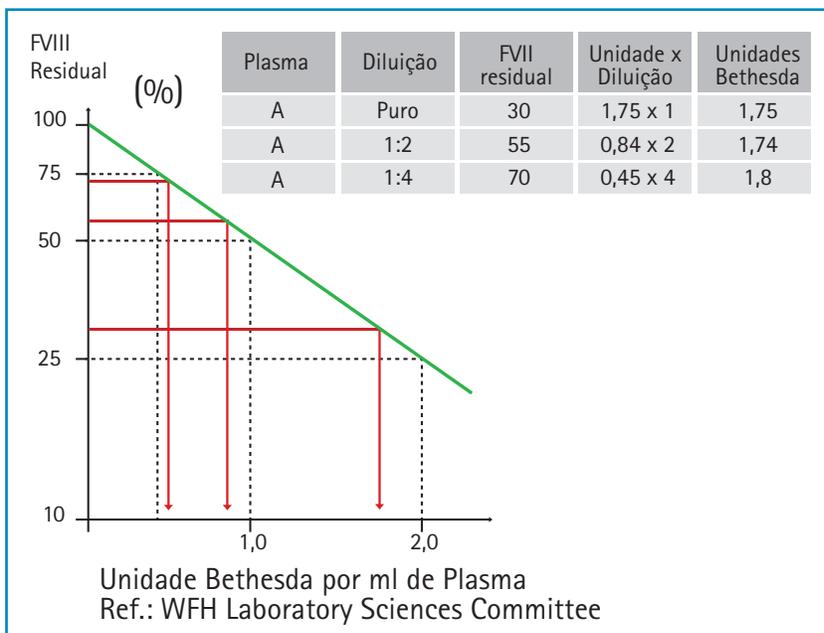
Cálculo da quantidade de inibidor:

Calcular a atividade residual de fator de cada diluição dividindo o valor da atividade do fator pelo valor da atividade do plasma controle e multiplicar o resultado por 100.

$$\text{Atividade do Fator Residual} = \frac{\text{Atividade de fator de cada diluição após a incubação}}{\text{Atividade de Fator do Controle}} \times 100$$

A atividade residual de fator VIII versus a unidade Bethesda é plotada em papel mono-log em uma escala aritmética.

Figura 7 – Ilustração gráfica da cinética tipo 1 de inibidor de fator VIII



Fonte: Adaptado do *Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual* – World Federation of Hemophilia, 2000 – com permissão.

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% corresponde a zero unidade Bethesda, enquanto 50% corresponde a 1 unidade Bethesda. A partir desse conceito é possível a realização de um gráfico que contenha a correlação entre a atividade de fator VIII residual e o título de inibidor. Os pontos são plotados em um gráfico log x linear, com os valores de 100%, 50% e 25% de atividade residual (eixo Y), correspondendo a 0, 1 e 2 unidades Bethesda (eixo X), respectivamente. Outra forma de cálculo é o uso da tabela Bethesda que refere para cada percentagem de fator residual, a unidade Bethesda correspondente.

Tabela 4 – Fator residual (%) correspondente às unidades Bethesda

Fator VIII Residual	Unidades Bethesda	Fator VIII Residual	Unidades Bethesda	Fator VIII Residual	Unidades Bethesda
97%	0,05	61%	0,70	40%	1,35
93%	0,10	59%	0,75	38%	1,40
90%	0,15	57%	0,80	37%	1,45
87%	0,20	55%	0,85	35%	1,50
84%	0,25	53%	0,90	34%	1,55
81%	0,30	51%	0,95	33%	1,60
78%	0,35	50%	1,00	32%	1,65
75%	0,40	48%	1,05	30%	1,70
73%	0,45	46%	1,10	29%	1,75
70%	0,50	45%	1,15	28%	1,80
68%	0,55	43%	1,20	27%	1,85
66%	0,60	42%	1,25	26%	1,90
64%	0,65	41%	1,30	25%	2,00

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

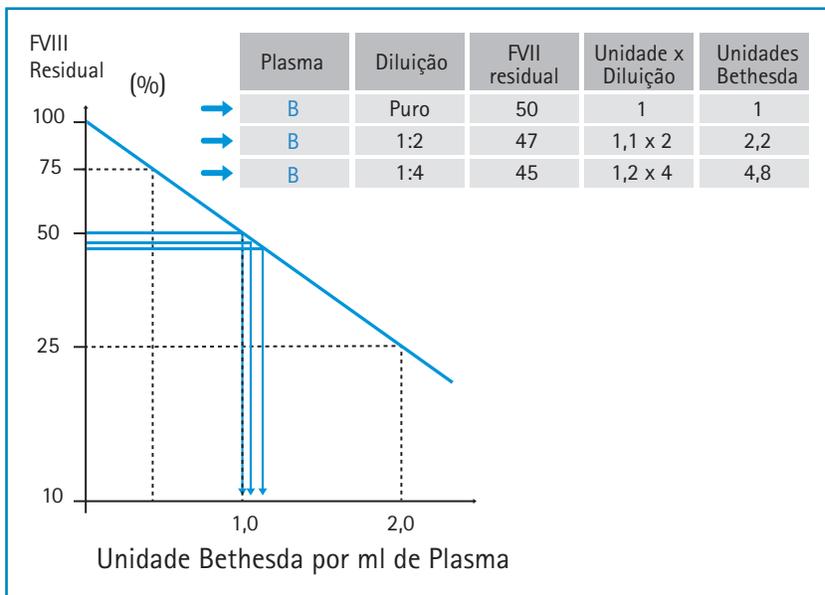
Os títulos de inibidor menores que 0,6 UB/mL de plasma são considerados negativos.

É importante salientar que só é possível calcular o título do inibidor quando a atividade residual do fator estiver entre 25% e 75%. Em casos em que o título é muito alto, são necessárias várias diluições da amostra do paciente para alcançar no mínimo os 25% de fator residual. Além disso, o cálculo final depende da cinética do anticorpo, tipo 1 ou 2. Na cinética do tipo 1, a mais frequente nos pacientes hemofílicos, deve-se considerar a diluição cujo fator residual estiver mais próximo a 50%, mas os resultados das diferentes diluições não diferem significativamente entre si (Figura 7).

Na cinética do tipo 2 o anticorpo neutraliza de maneira incompleta a proteína do fator da coagulação e, conseqüentemente, os resultados são diferentes nas diluições distintas da amostra.

Na Figura 8 é mostrada uma ilustração gráfica da cinética tipo 2 de inibidor de fator VIII com resultados distintos. Nesse caso de cinética do tipo 2, o resultado deve ser baseado na menor diluição em que se obtém maior ou igual a 25% de fator residual. Nesse exemplo o resultado foi encontrado na amostra sem diluição apresentando 50% de fator residual equivalente a 1 UB/mL.

Figura 8 – Ilustração gráfica da cinética tipo 2 de inibidor de fator VIII



Fonte: Adaptado do Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual – World Federation of Hemophilia, 2000 – com permissão.

Observação sobre os volumes usados nas reações:

Vários fatores influenciam o volume a ser usado nas reações descritas anteriormente, entre eles o método (manual x automatizado), volume de plasma disponível (adulto x criança) etc. Dessa 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 estes testes.

A mesma técnica pode ser empregada para a quantificação do inibidor de fator IX, porém o tempo de incubação da(s) mistura(s) e do controle poderá ser de apenas 10 minutos, uma vez que o inibidor de fator IX não apresenta característica tempo dependente.

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. 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 FVII é autossômica recessiva, resultando em doença hemorrágica de gravidade variável. A prevalência parece ser aproximadamente 1:300.000. É subdividida em deficiência do tipo I, caracterizada por diminuição concomitante da atividade e do antígeno e tipo II com discrepância entre a atividade, que é sempre diminuída, enquanto que o antígeno pode ser normal, próximo ao normal ou reduzido.

O diagnóstico laboratorial inicia-se com o teste de triagem, tempo de protrombina (TP), que se prolonga de acordo com o grau de deficiência do fator, e confirmado pela determinação da atividade do fator VII por teste coagulométrico ou funcional.

Tromboplastinas de diferentes origens, utilizadas nos testes, podem elucidar a discrepância de deficiência de fator VII do tipo II. Nos anos 80, foi descrita a mutação Arg304Gln, conhecido como FVII Pádua. Nesta variante, a atividade do FVII é baixa quando usada tromboplastina de cérebro de coelho, enquanto que a atividade é normal com tromboplastina de cérebro bovino. Atividades intermediárias são obtidas quando empregadas placenta humana ou recombinante humano. A explicação de resultados normais de FVII Pádua com a tromboplastina de cérebro bovino é devido à alta sensibilidade ao FVII ativado que circula em níveis elevados.

Método coagulométrico ou funcional

Princípio

O método consiste em ativar a via extrínseca da coagulação, com tromboplastina e cálcio em uma mistura de plasma teste diluído e plasma substrato deficiente em fator VII. O teste pode ser realizado manualmente, em banho-maria a 37°C ou em coagulômetros semi

ou totalmente automatizados.

Inicialmente, é realizada uma curva de calibração a partir de diluições seriadas de um plasma calibrador (calibrado a partir do plasma referência da Organização Mundial da Saúde), em tampão indicado pelo fabricante do plasma deficiente.

Reagentes e materiais

- ▶ Plasma substrato deficiente em fator VII
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Tampão Imidazol, ou Veronal, ou Owren – dependerá da marca do plasma deficiente
- ▶ Plasma calibrador
- ▶ Amostra teste (plasma pobre em plaquetas – PPP)
- ▶ Micropipetas de 100 μL , 200 μL e 1.000 μL com volume regulável
- ▶ Tubos plásticos para a diluição do plasma calibrador e amostras
- ▶ Tubo de vidro 12x75 mm
- ▶ Banho-maria a 37°C
- ▶ Cronômetro
- ▶ Papel di-log

Procedimento

Curva de calibração

Preparar os reagentes de acordo com as instruções do fabricante. Preparar as diluições seriadas do plasma calibrador, em tampão, sendo que a primeira diluição é preparada de acordo com as instruções do fabricante do substrato de FVII, 1/5 ou 1/10, e a atividade será o valor descrito na bula do calibrador. É recomendável que a curva de

calibração seja realizada com no mínimo seis pontos.

Caso a temperatura ambiente seja superior a 25°C, é necessário manter os tubos plásticos contendo as diluições do plasma calibrador e os tubos contendo a amostra do paciente diluída 1/5 ou 1/10 em banho de gelo até a análise.

As amostras de pacientes para a determinação do FVII devem ser descongeladas a 37°C por até cinco minutos, somente após a realização da curva referência e validação com controles normal e patológico.

Adicionar em tubo de vidro a 37°C

Cada diluição (pontos da curva)..... 100 µL

Substrato deficiente em fator VII 100 µL

Homogeneizar e incubar por 2 minutos a 37°C e adicionar:

Tromboplastina cálcica preaquecida a 37°C 200 µL

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

Realizar o branco da reação, adicionando 100 uL do tampão utilizado nas diluições e prosseguir a realização do teste. A atividade deve ser abaixo de 1%.

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 referencia 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, sendo que a condição heterozigótica geralmente cursa sem manifestação hemorrágica, enquanto que a homozigótica apresenta sintomas leves, moderados ou graves. O diagnóstico laboratorial é baseado no prolongamento do TP e do TTPA (dependendo dos níveis plasmáticos) e na baixa atividade do fator realizada por ensaio funcional ou coagulométrico.

Método funcional

Princípio

O método de um estágio consiste em ativar a via extrínseca, com fosfolípides e cálcio em uma mistura de plasma teste diluído e plasma substrato deficiente em fator V (com concentração normal de todos os demais fatores da coagulação). O teste pode ser realizado manualmente em banho-maria a 37°C ou por equipamentos semi ou totalmente automatizados.

Inicialmente, é realizada uma curva de calibração a partir de diluições seriadas de um plasma calibrador (calibrado a partir do plasma referência da Organização Mundial da Saúde), em tampão cuja composição é dependente do plasma substrato deficiente em FV comercial utilizado.

Reagentes e materiais

- ▶ Plasma Substrato deficiente em fator V
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Tampão Imidazol, ou Veronal, ou Owren
- ▶ Plasma calibrador
- ▶ Amostra teste (plasma pobre em plaquetas – PPP)
- ▶ Micropipetas de 100 µL, 200 µL e 1.000 µL com volume ajustável

- ▶ Tubos plásticos para a diluição do plasma calibrador e amostras
- ▶ Tubo de vidro 12x75 mm
- ▶ Banho-maria a 37°C
- ▶ Cronômetro
- ▶ Papel di-log

Procedimento

Curva de calibração

Preparar os reagentes de acordo com as instruções do fabricante. Preparar as diluições seriadas do plasma calibrador, em tampão, sendo que a primeira diluição é preparada de acordo com as instruções do fabricante do substrato de FV, 1/5 ou 1/10, e a atividade será o valor descrito na bula do calibrador referente ao fator a ser determinado. É recomendável que a curva de calibração seja realizada com no mínimo seis pontos.

Caso a temperatura ambiente seja superior a 25°C, é necessário manter os tubos plásticos contendo as diluições do plasma calibrador e os tubos contendo a amostra do paciente diluída 1/5 ou 1/10 em banho de gelo até a análise.

As amostras de pacientes para a determinação do fator V devem ser descongeladas a 37°C por até cinco minutos, somente após a realização da curva referência e validação com controles normal e patológico.

Reação

Adicionar em tubo de vidro a 37°C

Cada diluição 100 µL

Substrato deficiente em fator V..... 100 µL

Homogeneizar e incubar por 2 minutos a 37°C e adicionar:

Tromboplastina cálcica preaquecida a 37°C 200 µL

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

Realizar o branco da reação, adicionando 100 uL do tampão utilizado nas diluições e prosseguir a realização do teste. Os resultados devem ser inferiores a 1%.

Se a deficiência do fator V for leve (30% a 40%) e o TTPa também apresentar prolongamento, é aconselhável a determinação do fator VIII da amostra para investigar a deficiência conjunta de fatores V e VIII.

Valores de referência

O valor de referencia deve ser estabelecido localmente.

9.3.3 Deficiência de fator X

O fator X, vitamina K dependente, é primeira enzima envolvida no mecanismo comum de formação do coágulo na cascata da coagulação e foi descrito na década de 50 por dois grupos independentes.

A deficiência congênita de fator X é decorrente à 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.

A atividade de fator X pode ser determinada por cinco diferentes testes de princípios diferentes, mas aqueles fundamentados no TP ou TTPa de um estágio são suficientes para o diagnóstico.

Método funcional ou coagulométrico

Princípio

A maioria dos laboratórios determina a atividade do FX por ativação da via extrínseca com fosfolípidos e cálcio em uma mistura de plasma teste diluído e plasma substrato deficiente em fator X (com concentração normal de todos os demais fatores da coagulação). O teste pode ser realizado manualmente em banho-maria a 37°C ou por equipamentos semi ou totalmente automatizados.

Inicialmente, é realizada uma curva de calibração a partir de diluições seriadas de um plasma calibrador (calibrado a partir do plasma referência da Organização Mundial da Saúde), em tampão indicado pelo fabricante do plasma deficiente.

Reagentes e Materiais

- ▶ Plasma substrato deficiente em fator X
- ▶ Tromboplastina cálcica
- ▶ Tampão Imidazol, ou Veronal, ou Owren
- ▶ Plasma calibrador
- ▶ Micropipetas de 100 μL , 200 μL e 1.000 μL com volume regulável
- ▶ Tubos plásticos para a diluição do plasma calibrador e amostras
- ▶ Tubo de vidro 12x75 mm
- ▶ Banho-maria a 37°C
- ▶ Cronômetro
- ▶ Papel di-log

Procedimento

Curva de calibração

Preparar os reagentes de acordo com as instruções do fabricante.

Preparar as diluições seriadas do plasma calibrador, em tampão, sendo que a primeira diluição é preparada de acordo com as instruções do fabricante do substrato de FX, 1/5 ou 1/10, e a atividade será o valor descrito na bula do calibrador referente ao fator a ser determinado. É recomendável que a curva de calibração seja realizada com no mínimo seis pontos.

Caso a temperatura ambiente seja superior a 25°C, é necessário manter os tubos plásticos contendo as diluições do plasma calibrador e os tubos contendo a amostra do paciente diluída 1/5 ou 1/10 em banho de gelo até a análise.

As amostras de pacientes para determinação de fator X devem ser descongeladas a 37°C por até cinco minutos, somente após a realização da curva referência e validação com controles normal e patológico.

Reação

Adicionar em tubo de vidro a 37°C

Cada diluição 100 µL

Substrato deficiente em fator X 100 µL

Misturar e incubar por dois minutos a 37°C e adicionar:

Tromboplastina cálcica preaquecida a 37° C..... 200 µL

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

Realizar o branco da reação, adicionando 100 uL do tampão utilizado nas diluições e prosseguir a realização do teste. Os resultados devem ser inferiores a 1%.

Resultados

Os resultados expressam-se em unidades/ml (U/ml) ou em %. A cada lote de reativos deve ser realizada nova curva de calibração ou quando os valores dos controles não estiverem dentro do esperado. Plotar a percentagem da diluição na abscissa em papel di-log 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 e é muito mais rara que as hemofilias A e B, com incidência de aproximadamente 5% na população de judeus Ashkenazes da Europa Central.

Geralmente, causa quadro hemorrágico de gravidade moderada e muitas vezes somente é diagnosticado durante ou após intervenção cirúrgica devido ao sangramento.

Método Funcional

Princípio

O método baseia-se na ativação da via intrínseca com adição da cefalina, ativador da fase de contato e cálcio a uma mistura de plasma diluído (1/5 ou 1/10 dependendo das instruções do fabricante do substrato deficiente em fator XI) e substrato deficiente em fator XI.

Reagentes e materiais

- ▶ Plasma deficiente em fator XI
- ▶ Tampão Imidazol, pH 7,3
- ▶ Cefalina ativada
- ▶ Cloreto de cálcio 0.025 M
- ▶ Plasma calibrador
- ▶ Amostra do plasma teste (plasma citratado pobre em plaquetas – PPP)
- ▶ Micropipetas de 100 µL, 200 µL e 1.000 µL com volume regulável
- ▶ Tubos plásticos para a diluição do plasma calibrador e das amostras
- ▶ Tubo de vidro 12x75 mm
- ▶ Banho-maria a 37°C

- ▶ Cronômetro
- ▶ Papel di-log

Curva de calibração

Preparar os reagentes de acordo com as instruções do fabricante.

Preparar as diluições seriadas do plasma calibrador, em tampão, sendo que a primeira diluição é preparada de acordo com as instruções do fabricante do substrato de FXI, 1/5 ou 1/10, e a atividade será o valor descrito na bula do calibrador referente ao fator a ser determinado. É recomendável que a curva de calibração seja realizada com no mínimo seis pontos.

Caso a temperatura ambiente seja superior a 25°C, é necessário manter os tubos plásticos contendo as diluições do plasma calibrador e os tubos contendo a amostra do paciente diluída 1/5 ou 1/10 em banho de gelo até a análise.

As amostras de pacientes para determinação de fator X devem ser descongeladas a 37°C por até cinco minutos somente após a realização da curva referência e validação com controles normal e patológico.

Reação

Adicionar no tubo de vidro a 37°C

Substrato deficiente em fator XI 100 µL

Plasma diluído..... 100 µL

Reagente de TTPA..... 100 µL

Incubar a 37°C por 3 minutos e adicionar:

Cloreto de cálcio 0.025 M preaquecido a 37°C 100 µL

Realizar o branco da reação, adicionando 100 uL do tampão utilizado nas diluições e prosseguir a realização do teste. A atividade deve ser inferior a 1%.

Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

9.3.5 Deficiência de fator XII

A deficiência congênita de fator XII é de caráter autossômico recessivo com implicações clínicas controversas. Embora a deficiência de fator XII prolongue o TTPA, não há risco de sangramento. Há vários relatos na literatura que associam a deficiência à trombose.

Método Funcional:

Procedimento

Reagentes e matérias

- ▶ Plasma deficiente em fator XII
- ▶ Tampão Imidazol, pH 7,3
- ▶ Reagente de TTPA
- ▶ Cloreto de cálcio 0.025 M
- ▶ Plasma calibrador
- ▶ Amostra teste (plasma citratado pobre em plaquetas)
- ▶ Micropipetas de 100 µL e 1.000 µL com volume regulável
- ▶ Tubos plásticos para a diluição do plasma calibrador e amostras
- ▶ Tubo de vidro 12x75 mm
- ▶ Banho-maria a 37°C
- ▶ Cronômetro
- ▶ Papel di-log

Curva de calibração

Preparar os reagentes de acordo com as instruções do fabricante.

Preparar as diluições seriadas do plasma calibrador, em tampão, sendo que a primeira diluição é preparada de acordo com as instruções do fabricante do substrato de FXII, 1/5 ou 1/10, e a atividade será o valor descrito na bula do calibrador referente ao fator a ser determinado. É recomendável que a curva de calibração seja realizada com no mínimo seis pontos.

Caso a temperatura ambiente seja superior a 25°C, é necessário manter os tubos plásticos contendo as diluições do plasma calibrador e os tubos contendo a amostra do paciente diluída 1/5 ou 1/10 em banho de gelo até a análise.

As amostras de pacientes para determinação de fator X devem ser descongeladas a 37°C por até cinco minutos, somente após a realização da curva referência e validação com controles normal e patológico.

Reação

Adicionar no tubo de vidro

Substrato deficiente em fator XII..... 100 µL

Plasma diluído..... 100 µL

Reagente de TTPA..... 100 µL

Incubar a 37°C por 3 minutos e adicionar:

Cloreto de cálcio 0.025 M preaquecida a 37°C..... 100 µL

Realizar o branco da reação, adicionando 100 uL do tampão utilizado nas diluições e prosseguir a realização do teste. A atividade deve ser inferior a 1%.

Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

9.3.6 Deficiência de fator XIII

A deficiência congênita de fator XIII foi descrito por DUCKERT, JUNG e SHMERLING, em 1960, e está associada a sangramento tardio, principalmente nos casos com menos que 5% 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 a 5 milhões de pessoas. Devido à sua função de estabilização da fibrina, a deficiência de FXIII não altera os testes TP, TTPA, TT, mesmo nos casos mais graves da doença.

São descritas três metodologias para a avaliação do FXIII.

1. Avaliação qualitativa ou teste de triagem da solubilidade do coágulo em solução de uréia 5M ou solução de ácido acético a 1%. O teste tem baixa sensibilidade, detectando níveis plasmáticos mínimos de 2%-3%. Mas é útil como teste de triagem, pois o sangramento por deficiência de FXIII ocorre em níveis plasmáticos inferiores a 5%.
2. Avaliação da função e quantidade por substrato cromogênico.
3. Determinação do FXIII antígeno por aglutinação de partículas de látex. Os dois últimos testes apresentam maior sensibilidade, tanto na confirmação da deficiência quanto na detecção de casos leves e moderados para estudos familiares.

Procedimento do teste de Solubilidade do coágulo na presença de uréia 5M ou ácido acético 1%

Princípio

Na cascata da coagulação a fibrina é formada a partir do fibrinogênio, por ação da trombina. A polimerização da fibrina, tornando-a estável, é realizada pela presença de fator XIII ativado que promove a formação de ligações fortes ou covalentes. Na ausência de FXIII a fibrina não é polimerizada e, portanto, dissocia-se facilmente. As soluções de ureia 5M e ácido acético 1% dissociam apenas a fibrina com ligações fracas, ou seja, quando os níveis plasmáticos fator XIII estiverem abaixo de 5%.

Procedimento

Adicionar em tubo de vidro:

Plasma do paciente..... 200 µL

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

Trombina (10 UI/mL)..... 100 µL

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

Solução de ureia 5M ou ácido acético 1%..... 3 mL

Estas soluções devem ser preparadas no momento do uso.

Após tampar os tubos, homogeneizar a mistura por inversão delicada 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.

Em se tratando da solução de ácido acético, observar o coágulo após 10 e 30 minutos.

O tempo de dissolução é diretamente proporcional à concentração de fator XIII presente no plasma. O tempo de observação de dissolução do coágulo 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 estão 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 frequente.

A classificação da deficiência é facilitada após a comparação dos resultados obtidos pelo método de Clauss, que avalia a quantidade e a função do fibrinogênio. Este método é o mais utilizado para a avaliação do fibrinogênio e pode ser realizado por técnica manual ou automatizada.

Método de Clauss

Princípio

Em presença de um excesso de trombina, o tempo de coagulação de um plasma diluído de acordo com o fabricante da trombina, é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio plasmático. O tempo de coagulação do plasma teste é comparado ao tempo de coagulação do plasma calibrador em diferentes diluições.

Reagentes e materiais

- ▶ Plasma citratado pobre em plaquetas
- ▶ Tampão de Owren pH 7.35
- ▶ Plasma calibrador para fibrinogênio
- ▶ Trombina de concentração aproximada a 33 UI/mL
- ▶ Micropipetas de 100 μ L, 200 μ L e 1.000 μ L com volume regulável
- ▶ Tubos plásticos para a diluição do plasma calibrador e amostras
- ▶ Tubo de vidro 12x75 mm
- ▶ Banho-maria a 37°C
- ▶ Cronômetro
- ▶ Papel di-log

Reação

Plasma diluído (calibrador ou paciente)..... 200 μ L

Incubar a 37°C por 2 minutos

Acionar o cronômetro ao adicionar a trombina..... 200 μ L

Registrar o tempo de coagulação 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 frequentemente 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 o tempo de coagulação da amostra 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 diluição.

Valores de referência

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

9.3.8 Deficiência de fator II (protrombina)

A deficiência hereditária de fator II é transmitida de modo autossômico e recessivo, sendo a forma grave é muito rara. A deficiência pode ser quantitativa ou qualitativa. Na deficiência quantitativa da protrombina, a quantidade e função estão diminuídas proporcionalmente, como ocorre na hipoprotrombinemia. Enquanto que na deficiência qualitativa os níveis plasmáticos do antígeno são normais ou discretamente diminuídos e a função diminuída, tal como na disprotrombinemia.

O diagnóstico laboratorial da deficiência da protrombina é sugestivo a partir do prolongamento do TP, discreto prolongamento do TTPA, TT normal e a determinação do fator II por método funcional ou coagulométrico. A diferenciação entre deficiência quantitativa e qualitativa é feita com o auxílio do teste imunológico de determinação do antígeno da protrombina.

Reagentes e materiais

- ▶ Plasma substrato deficiente em fator II
- ▶ Tromboplastina calcica
- ▶ Tampão Michaelis pH 7.35
- ▶ Plasma calibrador
- ▶ Plasma teste citratado pobre em plaquetas
- ▶ Micropipetas de 100 μL , 200 μL e 1.000 μL com volume regulável
- ▶ Tubos plásticos para a diluição do plasma calibrador e amostras
- ▶ Tubo de vidro 12x75 mm
- ▶ Banho-maria a 37°C
- ▶ Cronômetro
- ▶ Papel di-log

Curva de calibração

Preparar os reagentes de acordo com as instruções do fabricante

Preparar as diluições seriadas do plasma de referência, em tampão, sendo que a primeira diluição é preparada de acordo com as instruções do fabricante do substrato de FII, 1/5 ou 1/10, e a atividade será o valor descrito na bula do calibrador referente ao fator a ser determinado. É recomendável que a curva de calibração seja realizada com no mínimo seis pontos.

Caso a temperatura ambiente seja superior a 25°C, é necessário manter os tubos plásticos contendo as diluições do plasma calibrador e os tubos contendo a amostra do paciente diluída 1/5 ou 1/10 em banho de gelo até a análise.

As amostras de pacientes para determinação de fator II devem ser descongeladas a 37°C por até cinco minutos somente após a realização da curva referência e validação com controles normal e patológico.

Reação

Adicionar em tubo de vidro a 37°C

Cada diluição..... 100 µL

Substrato deficiente de fator II..... 100 µL

Misturar e incubar por 2 minutos a 37°C e adicionar:

Tromboplastina cálcica preaquecida a 37°C..... 200 µL

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

Realizar o branco da reação, adicionando 100 µL do tampão utilizado nas diluições e prosseguir a realização do teste. A atividade deve ser inferior a 1%.

Resultados

Plotar a porcentagem da diluição na abscissa em papel di-log, 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 deles.

Valores de referência:

O valor de referência deve ser estabelecido localmente.

10 PLAQUETOPATIAS

10.1 Introdução

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos, anucleados, derivados do megacariócitos. Circulam na periferia do vaso na forma discoide com diâmetro que varia de 2 a 4 micras e com a espessura de 0.9 micras. Quando ativadas emitem pseudópodes e mudam para a forma esférica. No sangue periférico circula aproximadamente por 10 dias o número dessas células pode variar de 150 a 450 mil/mm³.

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

Adesão plaquetária

Quando o vaso é lesado ocorre exposição dos componentes subendoteliais (colágenos, fibronectina e laminina). O fator de von Willebrand (FVW) circulante facilita a adesão inicial se ligando ao complexo glicoproteico 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 de ativação plaquetária inclui mudanças da forma (esferoide) com emissão de pseudópodes e exposição de fosfolípidos de carga negativa (flip-flop), 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 (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 no local próximo à 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-selectina, fator plaquetário 4, -tromboglobulina, fatores de crescimento derivados de plaquetas, inibidor do plasminogênio, vitronectina e trombospondina. Dos grânulos densos: ADP, ATP, íons de 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 ciclooxigenase (COX) tendo como produto o eicosanoide tromboxano A2 (TXA2), 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 sistema canicular aberto da plaqueta.

Outros processos bioquímicos envolvidos na agregação e secreção plaquetária

O ADP liberado, a trombina gerada no início da cascata da coagulação, colágeno e TXA2 ligam-se aos receptores de membrana 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, 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 TXA2, exposição da membrana pró-coagulante e do complexo glicoproteico IIb-IIIa.

Alterações de função 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.

10.2 Alterações plaquetárias quantitativas: plaquetopenias e plaquetoses

Plaquetopenias

As plaquetopenias são classificadas de acordo como o número de plaquetas circulantes, leve, moderada e grave se contagem for acima de 50 mil/mm³, entre 20 mil e 50 mil/mm³ e abaixo de 20 mil/mm³, respectivamente.

As plaquetopenias podem ter causas adquiridas ou hereditárias.

10.2.1 Plaquetopenias adquiridas

Uma das principais causas de plaquetopenia adquirida é 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, reconhecidos pelos contadores eletrônicos. A confirmação pode ser realizada por contagem manual em câmara de Neubauer ou esfregação de sangue em lâmina. Esse fenômeno se deve à modificação antigênica na superfície plaquetária ocasionada pelo anticoagulante EDTA. Na maioria das vezes, a coleta de sangue em citrato de sódio, em vez 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 em EDTA com processamento rápido após a coleta, em citrato de sódio e/ou contagem das plaquetas em câmara ou esfregação do sangue periférico. Caso o novo resultado evidencie plaquetas normais, o diagnóstico sugestivo é de pseudoplaquetopenia. No caso de persistência do número reduzido e presença de aglutinação, o resultado deve ser liberado como plaquetas aglutinadas e prosseguir à investigação da possível causa.

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

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

10.2.2 Plaquetopenias hereditárias

Embora raras, as plaquetopenias hereditárias são classificadas tendo-se como base o tamanho das plaquetas ou a mutação genética que ocasionou a diminuição de produção. 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 -defeito de liberação, Fechtner e Epstein) e síndrome da plaqueta cinza (ausência de grânulo).

Plaquetoses

A plaquetose é a presença de grande número de plaquetas no sangue periférico. Pode ser primária (também denominada de

essencial e causada por doença mieloproliferativa) ou reativa que frequentemente é assintomática, mas podendo causar trombose em alguns pacientes.

Testes laboratoriais para a quantificação das plaquetas e caracterização de plaquetopenia hereditária

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

Contagem de plaquetas

Métodos manuais

- ▶ Método de Fônio
- ▶ Câmara de Neubauer

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 mm³ de sangue. Além de quantificar o número, o método de Fônio possibilita a avaliação da morfologia da plaqueta. Entretanto, este não é o método com boa exatidão.

Técnica

- ▶ Coletar o sangue com EDTA tomando os cuidados recomendados.
- ▶ Fazer o esfregaço do sangue em lâmina e corá-la com o corante de rotina.
- ▶ Contar as plaquetas existentes em, no mínimo, 10 campos com 200 eritrócitos por campo.

- ▶ Determinar o número de plaquetas considerando o número absoluto de eritrócitos por milímetro cúbico.

Interpretação

Alterações morfológicas das plaquetas

Plaquetas gigantes e macroplaquetas: a presença de macroplaquetas no sangue periférico sugere *turnover* acelerado de plaquetas. Estão presentes quando ocorre destruição periférica exagerada, como na púrpura trombocitopênica imunológica e trombooses 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 com auxílio de fluorocromo conjugado com o monoclonal CD61.

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

O volume plaquetário médio (VPM) tem sido utilizado para distinguir as plaquetopenias por redução da sobrevida 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 e por outro lado, hemácias microcíticas. Além

disso, estes equipamentos podem apresentar erros em contagens plaquetárias abaixo de 30.000/mm³.

Contagem de plaquetas em Câmara de Neubauer

Coleta

O sangue para a contagem de plaquetas deve ser colhido preferencialmente em EDTA. Em casos de suspeita de pseudoplaquetopenia, 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 e diluição

- ▶ 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 dois meses.

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, homogeneizar o sangue diluído, por cinco vezes, e aguardar 10 minutos para a hemólise completa.
- ▶ Preparar a câmara de Neubauer. A lamínula deve ficar totalmente fixada na câmara.
- ▶ Após 10 minutos da lise, homogeneizar novamente, preencher a câmara com o material, sem permitir a formação de bolhas ou extravasamento do líquido para fora da lamínula.
- ▶ Deixar em repouso por 10 minutos em câmara úmida (recipiente fechado com bolas de gaze umedecidas).

- ▶ Fazer a contagem das plaquetas presentes em 5 dos 25 quadrantes centrais (local de contagem de hemácias e plaquetas).
- ▶ Caso o número de plaquetas esteja abaixo de 10.000/mm³ as plaquetas presentes nos 25 campos devem ser contadas.

Valor normal: 150 mil a 450 mil/mm³

10.3 Alterações plaquetárias qualitativas (plaquetopatias)

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

10.3.1 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 doença de von Willebrand (DVW) e a síndrome de Bernard Soulier (diminuição ou ausência do complexo glicoproteico plaquetário Ib/IX/V).
- ▶ Defeitos primários na interação plaqueta-plaqueta (doença de agregação): 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, denso ou ambos.
- ▶ Doença de Quebec (estoque aberrante de ativador do plasminogênio tipo uroquinase degradando o conteúdo dos grânulos).

Doença de secreção plaquetária e transdução de sinal

- ▶ Defeitos de interação plaqueta – agonista devido a anormalidades nos receptores de TXA₂, ADP e colágeno.

- ▶ Alteração da metabolização do ácido araquidônico e síntese de TXA₂, devido à diminuição da liberação do ácido araquidônico, deficiência das enzimas ciclooxigenase 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 intracitoplasmático.
- ▶ Deficiência da proteína C quinase.

Doença de função pró-coagulante

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 (exemplo menorragia), a DVW, alteração de secreção e sinalização plaquetária são mais comuns que as deficiências de grânulos, defeitos na produção de TXA₂ e outras.

10.3.2 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, lúpus eritematoso sistêmico e situações como a circulação extracorpórea. Quanto às drogas, citam-se os anti-inflamatórios não esteroidais

como o ácido acetilsalicílico (AAS), ibuprofeno, acetaminofeno, anti-inflamatórios esteroidais, clopidogrel, ticlopidina, prazugrel, 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.

10.4 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
- ▶ Tempo de sangramento (TS)

Testes específicos

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

Testes especiais

- ▶ Avaliação da secreção do conteúdo intragranular (e densos):
 - Determinação plasmática de fator plaquetário 4
 - Determinação plasmática de-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) 1988, uma variedade de novos testes de função plaquetária foi disponibilizada e isso inclui a citometria de fluxo e outros equipamentos.

10.4.1 Testes de triagem

- ▶ Contagem de plaquetas: vide sessão 10.2
- ▶ Tempo de sangramento (TS – Ivy)

O teste TS foi introduzido nos anos 50 para a avaliação, in vivo, da hemostasia primária. Historicamente, o procedimento foi desenvolvido por Duke. Com auxílio de uma lanceta, é feita uma incisão no lóbulo da orelha e o sangramento é avaliado de 30 em 30 segundos até a parada. Mais tarde, Ivy modificou o teste realizando pequenas incisões no dorso do antebraço, mantido a uma pressão arterial constante. Com o lançamento no mercado dos chamados dispositivos ou templates, as incisões para o tempo de sangramento passaram a ser padronizadas tanto em relação ao tamanho quanto à profundidade. Porém, mesmo com o uso dos dispositivos, o teste de triagem apresenta várias desvantagens, motivo pelo qual está sendo descontinuado na prática clínica. É invasivo, pode promover a formação de quelóide, pouco reprodutível, depende do operador, baixa sensibilidade à disfunção leve e pouca correlação com a tendência a sangramento. Além disso, é

influenciado por vários fatores como idade, sexo, temperatura da pele, hematócrito, o local e a direção da incisão.

Nos últimos dez anos os grandes centros internacionais de hemostasia tem substituído o teste de triagem TS pelo equipamento analisador de função das plaquetas, no Brasil passou a ser utilizado somente ano de 2008, mas em poucos centros especializados.

10.4.2 Testes específicos

10.4.2.1 Agregação plaquetária por sistema óptico

O teste de agregação plaquetária por sistema óptico é considerado padrão ouro para a avaliação da função das plaquetas. O equipamento agregômetro detecta a transmissão luminosa que passa 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 de passagem de luz que é captada por um detector e um amplificador de sinal.

A metodologia consome tempo e deve ser realizada por profissional especializado que além do conhecimento teórico da fisiologia plaquetária, controle cuidadosamente as variáveis pré-analíticas e analíticas garantindo a confiabilidade dos resultados.

Apesar da ampla utilização da agregação plaquetária por sistema óptico e publicações de vários manuais, todas as etapas que compõem o método ainda não estão padronizadas.

Recentemente o subcomitê de fisiologia plaquetária da Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia publicou o consenso de vários laboratórios de referência, para a padronização da agregação plaquetária por sistema óptico quanto à utilização clínica do teste, variáveis pré-analíticas (coleta, processamento), escolha dos reagentes e concentrações utilizadas, técnica do procedimento e avaliação dos resultados.

Segundo o subcomitê, as variáveis pré-analíticas podem ser reduzidas quando seguidas as seguintes recomendações:

O sangue deve ser coletado após um período de descanso do paciente quando vai ao laboratório, para atenuar o efeito da liberação da adrenalina induzida pelo exercício físico, na agregação plaquetária.

- ▶ Indivíduos tabagistas devem abster-se de fumar no mínimo 30 minutos antes da coleta de sangue.
- ▶ Abstenção de café no mínimo 2 horas antes da coleta de sangue.
- ▶ Registro de todos os medicamentos que o paciente faz uso.
- ▶ Tratamento com drogas de efeito antiagregante com ação reversível devem ser descontinuados pelo menos três dias que antecedem a coleta (com a autorização do médico do paciente).
- ▶ Tratamento com drogas de efeito antiagregante com ação irreversível (ácido acetilsalicílico – AAS, tienopiridinas) devem ser descontinuados pelo menos dez dias que antecedem a coleta (com a autorização do médico do paciente). Quando o tratamento com drogas que alteram a função plaquetária não puder ser interrompido, o laboratório deve ser informado para melhor interpretação dos resultados.

Coleta

Punção e agulhas

Para a coleta adequada é muito importante a experiência e a destreza do flebotomista. O excesso de manipulação da agulha danifica o tecido, ocasionando maior exposição do subendotélio, liberação de fator tecidual e ativação plaquetária.

É recomendável a punção da veia com de agulhas de calibre 21 para os adultos e 23 para crianças, se possível sem garroteamento.

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 vários testes foi demonstrado que o uso de tubos a vácuo não promove ativação plaquetária, portanto podem ser utilizados.

Para evitar a contaminação indesejada entre os diferentes anticoagulantes o tubo contendo citrato de sódio deve ser o primeiro a ser coletado.

Anticoagulante

O citrato de sódio 3.2% ou 3.8%, na proporção de 1 volume de anticoagulante para 9 volumes de sangue, deve ser o anticoagulante para a coleta do sangue para agregação plaquetária. Nos casos em que o hematócrito estiver abaixo de 25% ou acima de 55%, faz-se necessária a correção do volume de anticoagulante tal como descrito no item 6.1.1.1.

Após a introdução do sangue nos tubos, esses devem ser homogeneizados, mesmo os tubos a vácuo, delicadamente (4 a 5 vezes) sem a formação de espuma para evitar a ativação da coagulação e plaquetas, além da hemólise.

Envio e processamento da amostra

O material deve ser identificado e enviado imediatamente ao laboratório à temperatura ambiente. As temperaturas extremas devem ser evitadas para a manutenção da integridade da amostra.

De acordo com os centros de referência, as amostras destinadas aos testes de função plaquetária não devem ser transportadas por sistema pneumático ou transporte motorizado por causarem a ativação das plaquetas durante o percurso. O sangue deve ser coletado próximo ao laboratório que realiza o exame.

Preparação do Plasma Rico em Plaquetas – PRP

Para a realização da agregação plaquetária por sistema óptico, o sangue é centrifugado a 200 g por 5 a 10 minutos à temperatura ambiente (sem opção de freio da centrífuga para evitar a ressuspensão das hemácias) para a obtenção do plasma rico em plaquetas (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 plástico com tampa. Deve-se evitar também a formação de espuma e contaminação com eritrócitos e leucócitos.

Após leve homogeneização, uma pequena alíquota deve ser retirada para a contagem das plaquetas do PRP. Quando o plasma rico em plaquetas apresentar número inferior a 150 mil/mm³ os resultados não são confiáveis e a técnica de concentração do número de plaquetas por centrifugação não é recomendável, por induzir ativação.

De acordo com alguns autores, a resposta de agregação plaquetária sofre pouca influência quando o número de plaquetas do PRP varia entre 300 mil/mm³ a 600 mil/mm³. O reajuste do número de plaquetas do PRP deve ser realizado quando exceder a 600 mil/mm³, com solução fisiológica e não com plasma autólogo. A justificativa dessa mudança é devido à liberação de ADP por eritrócitos e plaquetas durante a centrifugação em alta rotação para a obtenção do plasma autólogo pobre em plaquetas. O agonista presente no plasma promove a dessensibilização dos receptores plaquetários de ADP resultando em diminuição de resposta de agregação.

A resposta plaquetária aos agonistas se altera ao longo do tempo. Logo após a preparação do PRP, as plaquetas são hiporresponsivas. A 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 3 a 4 horas.

Agentes agregantes plaquetários

Vários agentes agregantes podem ser empregados para o diagnóstico de plaquetopatias hereditárias e adquiridas, bem como para o controle de drogas antiagregantes como ADP (adenosina 5' difosfato), epinefrina ou adrenalina (ADR), colágeno, ácido araquidônico (AA), peptídeo ativador de receptor de trombina (TRAP), U46619 (reagente que mimetiza o tromboxano A₂), plasma bovino e ristocetina, como agentes aglutinantes.

A escolha dos reagentes para a investigação depende da suspeita clínica. Um exemplo é a doença trombostenia de Glanzmann que apresenta diminuição ou ausência do complexo glicoproteico IIb-IIIa plaquetário (GPIIb-IIIa). Para o seu diagnóstico os agonistas empregados são ADP, ADR, AA e colágeno, cuja agregação é dependente do complexo GPIIb-IIIa. O reagente ristocetina não é indicado nesse caso, pois o mecanismo de ação é modificar a estrutura F₁V para melhor interagir com a glicoproteína Ib da plaqueta. A ristocetina deve ser utilizada no auxílio de diagnóstico 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, e o volume utilizado na agregação plaquetária não deve exceder a 10% do volume do PRP para não ocorrer diluição das plaquetas.

ADP – a concentração da solução estoque é variável, depende da marca do reagente e equipamento utilizado. A maioria das marcas apresenta a concentração de 1 mM.

Concentrações finais recomendadas: 2 μ M a 10 μ M.

Interpretação da curva: geralmente, em indivíduos normais, a concentração final de 2 μ M promove duas ondas distintas de agregação, e de a 10 μ M as ondas se fundem. A primeira onda representa a interação do ADP com os seus receptores específicos (P2Y₁₂ e P2Y₁) e a presença das glicoproteínas IIb-IIIa; a segunda onda é a resposta de liberação endógena de ADP e metabolização

do ácido araquidônico em tromboxano A₂ (TXA₂), potente agente agregante.

Adrenalina ou epinefrina – a concentração da solução estoque também é variável. Muitos laboratórios, por problemas de custo, utilizam a epinefrina hospitalar (concentração aproximada de 1mM), porém geralmente apresentam baixa estabilidade.

Concentrações finais recomendadas: 5 µM a 10 µM.

Interpretação da curva: a adrenalina interage com os receptores – adenérgicos e assim como o ADP é dependente do complexo GPIIb-IIIa. A curva de agregação clássica consiste de uma primeira onda curta seguida de uma grande resposta secundária.

Colágeno – de acordo com a literatura, a suspensão mais estável é a derivada de tendão de equino (1 mg/mL).

Concentrações finais recomendadas: 1 a 5 µg/mL. O colágeno na concentração final de 1 µg/mL é utilizado na monitoração de inibição da ciclooxigenase promovida pelo ácido acetilsalicílico, como antiagregante. Já a concentração de 5 µg/mL avalia a via da fosfolipase C plaquetária.

Interpretação da curva: a resposta plaquetária ao colágeno é definida inicialmente por interação com os receptores plaquetários (GPIa/IIa; GPVI) que promove 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 agregam por meio dos receptores GPIIb-IIIa.

Ácido araquidônico (AA) – o reagente utilizado para a agregação plaquetária deve estar na forma de sal sódico, para melhor a sua solubilidade (solução estoque 50 mM). Uma das marcas existentes no mercado, de AA tem a formulação oleosa havendo a necessidade de ser misturada a albumina bovina, para melhor solubilidade.

Obs.: A solução estoque deve ser protegida da luz, não ter contato com oxigênio e para a prevenção de oxidação manter o tubo sempre tampado.

Concentrações finais recomendadas: 0,5 a 1,6 mg/mL.

Interpretação da curva: quando as plaquetas são estimuladas com o agonista AA em concentrações finais de 0.5 a 1,6 mM é avaliada a via enzimática da cicloxigenase. Ocorre uma rápida metabolização deste composto pela cicloxigenase a endoperóxidos cíclicos e TXA₂, com formação de uma única onda de agregação. Além de ser empregado para o diagnóstico laboratorial de deficiência hereditária da cicloxigenase e trombostenia de Glanzmann (deficiência ou ausência do complexo GPIIb-IIIa), é utilizado em alguns laboratórios para o controle terapêutico do antiagregante plaquetário, ácido acetilsalicílico (AAS) nas concentrações finais de 1 mM e 1,6 mM.

Ristocetina – é um antibiótico que atua como cofator da ligação FVW plasmático – GIb plaquetário. O reagente auxilia o diagnóstico não só de DVW como pseudoDVW e síndrome de Bernard Soulier.

As concentrações finais de uso para o diagnóstico de DVW e pseudoDVW estão discutidas no capítulo de DVW. No caso de síndrome de Bernard Soulier as plaquetas com ausência ou diminuição do complexo GPIb-IX-V respondem em concentrações acima de 1,2 mg/mL. A ristocetina é também utilizada na investigação da síndrome de Bernard Soulier.

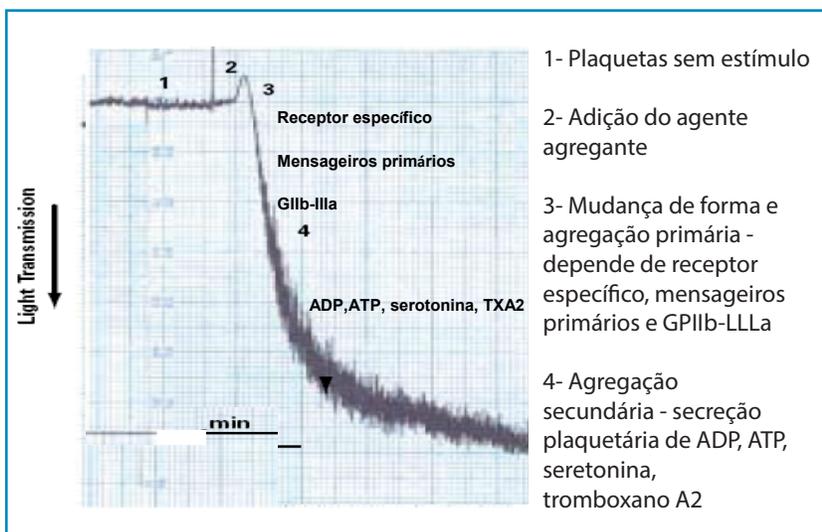
A diferenciação laboratorial da DVW e a síndrome de Bernard Soulier é realizada adicionando-se o plasma bovino ou crioprecipitado, ricos em FVW ($\pm 15 \mu\text{L}$), ao PRP contendo ristocetina na concentração em que as plaquetas não responderam (1,2 mg/mL). Caso após a adição do fator von Willebrand exógeno haja aglutinação plaquetária, fica demonstrado que a falta de resposta à ristocetina foi devido à deficiência do FVW plasmático. Caso contrário, caracteriza-se a ausência ou a deficiência da glicoproteína GPIb da plaqueta (Síndrome de Bernard Soulier).

Agregação espontânea (SPA) – deve ser realizada para todos os pacientes. O mesmo volume de PRP, que é utilizado para os agonistas plaquetários, é colocado no agregômetro sem estímulo. Se positiva (>20%) revela hiperagregação plaquetária, mesmo quando a resposta

estiver diminuída ou normal com os outros agentes agregantes. Neste manual não será abordado o tema "hiperagregação plaquetária ou plaqueta viscosa".

A agregação plaquetária por sistema óptico revela as diferentes fases da cinética de agregação quando o agente agregante é adicionado ao PRP (Figura 9).

Figura 9 – Cinética da agregação plaquetária sistema óptico

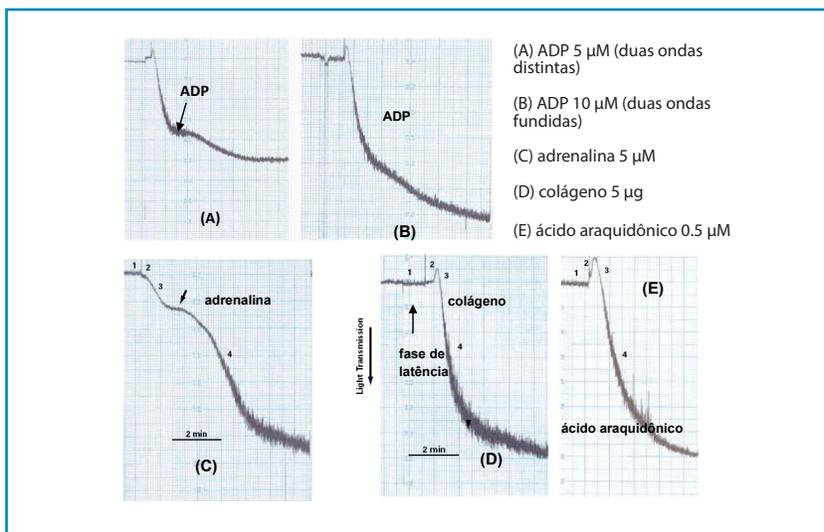


Fonte: Laboratório de Hemostasia USP.

A Figura 10 mostra as curvas características de agregação plaquetária com os agentes agonistas ADP, adrenalina, colágeno e ácido araquidônico.

Técnica de agregação plaquetária por sistema óptico ADP, adrenalina, por sistema óptico

Figura 10 – Curvas de agregação plaquetária colágeno e ácido araquidônico



Fonte: Laboratório de Hemostasia USP.

Expressão e avaliação dos resultados – Os resultados de agregação plaquetária por sistema óptico podem ser expressos.

- ▶ Amplitude de agregação (%), calculada: $(A/B) \times 100$, em que A = 0 a 100 de amplitude e B = o valor da amplitude de agregação das plaquetas do paciente.
- ▶ Presença de mudança de forma, no caso de agregação plaquetária com ADP.
- ▶ Comprimento da fase de latência ou "lag fase" no caso de agregação plaquetária com colágeno.
- ▶ Velocidade de agregação (*slope*).
- ▶ Desagregação da segunda onda.
- ▶ Avaliação qualitativa da agregação plaquetária (hipoagregante ou normo agregante).

Os laboratórios devem estabelecer os intervalos de referência de normalidade e validar o teste para cada lote e concentração do reagente utilizado.

Quando o parâmetro de avaliação da agregação plaquetária for por amplitude de agregação, apesar do estabelecimento prévio dos valores normais de referência, é importante observar o perfil das curvas de agregação. É possível que a amplitude de agregação esteja dentro dos valores de referência, mas com a ausência de segunda onda.

Considerações importantes:

- ▶ O tempo de reação deve ser entre 5 e 10 minutos.
- ▶ Os reagentes devem ser mantidos em banho de gelo durante a reação.
- ▶ PRP deve ser mantido 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 em outro momento para a confirmação do diagnóstico.
- ▶ O perfil de curva de agregação plaquetária deve ser sempre considerado.
- ▶ 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.

Interpretação da agregação plaquetária por sistema óptico

Devido ao grande número de fatores interferentes, a interpretação dos resultados de agregação plaquetária requer cautela. Como foram mencionados anteriormente, os medicamentos que contêm AAS não devem ser ingeridos durante os dez dias que antecedem a prova, a não ser que seu efeito sobre as plaquetas esteja sendo investigado. Além

do AAS, outras substâncias podem interferir na função plaquetária, assim como alguns componentes que fazem parte da "dieta normal" quando ingeridos em excesso, como álcool, cebola, alho, gengibre podem diminuir a agregação plaquetária. Várias drogas, alimentos e complementos podem interferir na função das plaquetas (Quadro 4).

Caso a amplitude de agregação plaquetária do paciente esteja dentro dos valores de normalidade estabelecidos pelo laboratório, a função plaquetária é considerada normal (lembrando que nas doses recomendadas, as plaquetas normais não apresentam desagregação). Entre os resultados de agregação plaquetária esperados, aproximadamente 16% da população geral apresenta hipoadesividade com epinefrina sem manifestação hemorrágica.

Quadro 4 – Drogas, alimentos e complementos que atuam na função plaquetária

Agente	Mecanismo de Ação
Abciximab (ReoPro)	Inibição GPIIb-IIIa
Ticlopidina, clopidogrel	Inibição receptores de ADP
Epoprostenol	Ativação da adenilciclase
Anti-inflamatórios não esteroidais (AAS)	Inibição da geração de TXA2
Bloqueadores de canais de cálcio	Inibição dos canais de cálcio
Antidepressivos tricíclicos, fluoxetina	Inibição da captação de serotonina
Estatinas	Interferência na via de sinalização
Anestésicos	Diminuição da agregação
Fenotiazínicos	Diminuição da agregação
Óleos de peixe	Redução da geração de TXA2
Vitamina E, cebola	Inibição do metabolismo do AA

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

O Quadro 5 apresenta o consenso norte americano de interpretação dos testes de agregação plaquetária por sistema óptico.

Quadro 5 – Consenso norte americano de interpretação dos testes de agregação plaquetária por sistema óptico

Resultados obtidos	Interpretação	Investigações futuras
Agregação ausente ou diminuída com AA , normal com análogo de TXA2 (U46619) e diminuída com baixa concentração de colágeno (1 ug/mL) e ausência da segunda onda com epinefrina .	Defeito aspirin-like (induzido por droga ou defeito hereditário da enzima cicloxigenase).	Repetir a agregação sem ingestão de AAS ou outras drogas anti-inflamatórias não esteroidal.
Somente agregação com ristocetina e ausente com todos os outros agentes agonistas.	Possivelmente trombastenia de Glanzmann (hereditária ou adquirida).	Repetir o teste em outro dia, caso o resultado se confirme. Análise das plaquetas do receptor de fibrinogênio GPIIb-IIIa por citometria de fluxo.
Agregação ausente com altas concentrações de ristocetina associada à plaquetopenia com presença de plaquetas gigantes (podendo ser de tamanho normal quando o defeito é adquirido).	Possivelmente síndrome de Bernard Soulier (hereditária ou adquirida); a DVW deve ser excluída.	Repetir o teste em outro dia, caso o resultado se confirme. Análise das plaquetas do receptor do FVW GPIb-IX-V por citometria de fluxo.
Agregação aumentada ou com ristocetina em baixas doses (<0,6 mg/mL).	Possivelmente DVW do tipo 2B ou pseudo-DVW	Repetir o teste em outro dia, caso o resultado se confirme. Determinação do antígeno e atividade do FVW e teste diferencial DVW e pseudo-DVW.
Agregação anormal com ADP epinefrina e colágeno . Resposta com ADP diminuída na primeira onda e ausente de segunda onda.	A possibilidade de defeito do receptor do ADP, P2Y12 deve ser considerada se o paciente não faz uso de clopidogrel.	Repetir o teste em outro dia para a confirmação.
Alteração de dois ou mais agonistas: ADP e colágeno com amplitudes reduzidas e ausência de resposta secundária a epinefrina deve ser considerada epinefrina, are considered epinefrina com ausência de segunda onda.	Esses achados sugerem que existe doença plaquetária. Os resultados devem ser confirmados em outra amostra, se for clinicamente indicado. Resultados considerados sugestivos de defeito de secreção plaquetária.	Pesquisa de liberação de ATP e/ou microscopia eletrônica dos grânulos densos.

Continua

Conclusão

Resultados obtidos	Interpretação	Investigações futuras
Anormalidade detectada com apenas um agonista (excluindo colágeno ou ristocetina).	Resposta de agregação alterada com um único agonista pode representar falsa positividade de doença plaquetária.	Repetir o teste em outro dia para a confirmação. Pesquisa de liberação de ATP e/ou microscopia eletrônica dos grânulos densos.

Fonte: (HAYWARD et al., 2010).

Concluindo, a agregação plaquetária por sistema óptico é a ferramenta mais utilizada para a avaliação da função das plaquetas em doenças hemorrágicas. Seu poder discriminatório entre indivíduos "assintomáticos" e com doença plaquetária hereditária aumenta à medida que se detectada a diminuição de amplitude de agregação em dois ou mais agentes agregantes. Apesar disso, ainda apresenta alguns problemas como falta de padronização das concentrações dos agentes agregantes, moderada reprodutibilidade dos resultados e moderada sensibilidade na detecção de doenças plaquetárias relacionadas à deficiência de grânulos. Foi demonstrado que 33% de pacientes com doença de grânulos densos apresentam agregação plaquetária normal. A confirmação da doença de grânulo dessa população de pacientes só é possível com o estudo de liberação de ATP e microscopia eletrônica das plaquetas.

10.4.2.2 Agregação plaquetária por sistema de impedância

A agregação por sistema de impedância elétrica não requer processamento do sangue, portanto as plaquetas não são ativadas. Em casos de hematócrito normal, o sangue total é diluído 50% com solução fisiológica, porém se estiver abaixo de 25%, recomenda-se utilizar a amostra sem diluição.

O método avalia a interação das plaquetas com eritrócitos e leucócitos e, além disso, favorece a investigação da função plaquetária em crianças e idosos devido ao pequeno volume de sangue utilizado.

Concentração dos reagentes

ADP – a agregação em sangue total requer concentrações finais de 5 μM e 10 μM .

Além de auxiliar no diagnóstico de plaquetopatias hereditárias, é o agonista de escolha para monitoração terapêutica das tienopiridinas (clopidogrel, ticlopidina e prazugrel).

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 μM .

Colágeno – quando utilizado em baixas concentrações (1 a 2 μg mL), é inibido por AAS e em concentrações mais altas (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a agregação plaquetária com colágeno não é afetada.

Trombina – apesar de ser um agente agonista forte, é mais utilizado na investigação de secreção plaquetária. Como agente agregante, a trombina induz a formação de fibrina o que dificulta a visualização da curva de agregação.

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 doença de von Willebrand do 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 mil/mm³

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.

10.5 Testes especiais

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

10.5.1 Avaliação de secreção plaquetária

Para dar continuidade à investigação a 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 por meio da determinação plasmática do fator plaquetário 4 (PF4) e tromboglobulina (TG) por *kits* comerciais de reação por ELISA. Outro marcador, que é amplamente utilizado, é a P-selectina que pode ser determinada no plasma como P-selectina 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 sequestrada pelos grânulos densos. O método se baseia na incubação das plaquetas em sangue total ou em PRP durante 30 minutos com serotonina marcada com carbono¹⁴. Posteriormente, as plaquetas são ativadas e a 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 e 10 μ M), colágeno (2 e 5 μ g/mL) e trombina (1U/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 com agonista forte, como é o caso da trombina e diminuída com ADP e colágeno 2 μ g/mL, sugere-se alteração de liberação e falta de conteúdo intragranular.

10.5.2 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 glicoproteicos de membrana plaquetária ou a proteínas que são liberadas durante a ativação, tais como P-selectina (grânulo) e granulofisina (grânulos lisossomais). Além de anticorpos, outras substâncias fluorescentes, como a mepacrina, podem ser utilizadas para a avaliação do conteúdo dos grânulos densos e também na detecção de plaquetas reticuladas (plaquetas circulantes jovens contendo RNA).

Anticorpos monoclonais utilizados

GIIb- IIIa: CD 41a para investigação de trombastenia de Glanzmann.

GPIb: CD 42b para investigação de síndrome de Bernard Soulier.

P-selectina: CD 62P para investigação de doença de estoque de grânulo e avaliação de ativação plaquetária.

Granulofisina: CD 63 (ausente na síndrome de Hermansky-Pudlak e aumentada na ativação plaquetária).

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

Avaliação do conteúdo dos grânulos densos: mepacrina.

10.5.3 Microscopia eletrônica

A metodologia é bastante complexa 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 em relação às doses dos agentes agregantes.
- ▶ O perfil de curva de agregação plaquetária por sistema óptico deve ser sempre considerado, independente dos resultados de amplitude máxima e velocidade de reação.
- ▶ As alterações na agregação plaquetária devem ser sempre repetidas para a confirmação do diagnóstico.

10.6 Novos equipamentos para a avaliação da função das plaquetas

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 do analisador 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 inter-relacionada à coagulação.
- ▶ Plateletworks®.

Deve-se enfatizar que ainda faltam estudos de evidência científica comprovando a eficácia da utilização destes equipamentos, principalmente para a monitoração de drogas antiagregantes.

10.6.1 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 pela força de cisalhamento, aderindo espontaneamente ao colágeno presente na membrana e agregando 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 (>300 segundos) 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, defeitos de secreção, a sensibilidade diminui consideravelmente.

Outra utilização do equipamento é na monitoração de drogas antiagregantes como ácido acetilsalicílico e clopidogrel.

10.6.2 VerifyNow

Princípio

O VerifyNow é um equipamento de detecção óptica que permite a avaliação qualitativa da função plaquetária em sangue total citratado. O sistema é exclusivo para monitorar a disfunção das plaquetas promovida por ingestão de drogas antiplaquetárias como ácido acetilsalicílico e abciximab.

10.6.3 Impact R

Princípio

O equipamento avalia as funções plaquetárias de adesão e agregação em condições próximas às fisiológicas, ou seja, em alta força de cisalhamento. O sangue total citratado é colocado em um copo de poliestireno e submetido a uma velocidade 1.800 rotações por segundo, durante dois minutos. Imediatamente as plaquetas que aderiram e agregaram são lavadas com água ou solução fisiológica e coradas. As plaquetas são analisadas com o auxílio de um microscópio de luz invertida. A adesão é avaliada pela área coberta de plaquetas (SC%) e agregação pelo tamanho dos agregados (AS μm^2).

Comentários finais

- ▶ 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.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Hemofilia congênita e inibidor**: manual de diagnóstico e tratamento de eventos hemorrágicos. Brasília, 2008.

_____. Ministério da Saúde; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 302, de 13 de outubro de 2005**. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. Brasília, 2005. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0302_13_10_2005.html>. Acesso em: 21 jun. 2016.

DUCKERT, F.; JUNG, E.; SHMERLING, D. H. A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency. **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 179-186, 1960.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays**. 5th ed. Wayne, 2008. (CLSI document H21-A5; v. 28, n. 5).

FAVALORO, E. J. Diagnosis and classification of von Willebrand disease: a review of the differential utility of various functional von Willebrand factor assays. **Blood Coagulation & Fibrinolysis**, [S.l.], v. 22, n. 7, p. 553-564, 2011.

HAYWARD, C. P. M. et al. Development of North American Consensus Guidelines for Medical Laboratories That Perform and Interpret Platelet Function Testing Using Light Transmission Aggregometry. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 134, p. 955-963, 2010.

KITCHEN, S.; MCCRAW, A.; ECHENAGUCIA, M. **Diagnosis of haemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual.** Montreal: World Federation of Hemophilia, 2000.

_____. **Diagnosis of Hemophilia and other bleeding disorders: a laboratory manual.** 2nd ed. Montréal: WFH, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL. **Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial para coleta de sangue venoso.** 2. ed. Barueri, SP: Minha Editora, 2010.

BIBLIOGRAFIA

ADCOCK, D. M. et al. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 107, n. 1, p. 105-110, 1997.

ANDREAE, M. C.; AMANULLAH, A. et al. Congenital factor XIII deficiency: a patient report and review of the literature. **Clinical Pediatrics**, Philadelphia, 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**, [S.l.], v. 88, n. 5, p. 582-592, 2003.

BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Manual de diagnóstico e tratamento da doença de von Willebrand**. Brasília, 2006.

BUDDE, U. et al. Laboratory diagnosis of congenital von Willebrand disease. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, [S.l.], v. 28, n. 2, p. 173-190, 2002.

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. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 109, n. 3, p. 347-352, 1998.

CATTANEO, M. et al. Platelet aggregation studies autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. **Haematologica**, [S.l.], v. 92, p. 694, 2007.

CHEN, D. et al. Validation of an automated latex particle-enhanced immunoturbidimetric von Willebrand factor activity assay. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [S.l.], v. 10, p. 1993-2002, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Protocol for Evaluation, Validation, and implementation of Coagulometers**. Wayne, 2008. (Replaces H57-A; v. 28, n. 4).

EVANS, R. J.; AUSTEN, D. E. Assay of ristocetin cofactor using fixed platelets and a platelet counting technique. **British Journal of Haematology**, [S.l.], 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 Coagulation & Fibrinolysis**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 285-291, 1991.

_____. et al. Evaluating errors in the laboratory identification of von Willebrand disease in the real world. **Thrombosis Research**, [S.l.], v. 34, n. 2, p. 393-403, Aug. 2014.

_____. et al. Von Willebrand disease and platelet disorders. **Haemophilia**, [S.l.], v. 20, n. 4, p. 59-64, 2014.

FEDERICI, A. B. et al. Guidelines for the diagnosis and management of von Willebrand disease in Italy. **Haemophilia**, [S.l.], v. 8, n. 5, p. 607-621, 2002.

FORBES, C. D. M. **R Genetic disorders of blood coagulation: clinical presentation and management**. Philadelphia, WB: Saunders Company, 1991. p. 141-202.

GRESELE, P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [S.l.], v. 13, p. 314-322, 2015.

GRUPO ARGENTINO DE HEMOSTASIA Y TROMBOSIS. Fundamentos para el manejo practico en el laboratorio de hemostasia. **Hematologia**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 95, enero/abr. 2014.

GUIDELINES on platelet function testing: the British Society for Haematology. BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. **Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 41, p. 1322-1330, 1988.

HARRISON, P. Assessment of platelet function in the laboratory. **Hamostaseologie**, [S.l.], v. 29, n. 1, p. 25-31, 2009.

HASSAN, A. A.; KROLL, M. H. Acquired disorders of plateletet function. **American Society of Hematology Education Program**, [S.l.], 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 (UKHCDO). **British Journal of Haematology**, [S.l.], v. 111, n. 1, p. 78-90, 2000.

HAYWARD, C. P. Diagnosis evaluation of platelet function disorders. **Blood Reviews**, [S.l.], v. 25, p. 173-189, 2011.

_____; MOFFAT, K. A. Laboratory testing for bleeding disorders: strategic uses of high and low-yield tests. **International Journal of Laboratory Hematology**, [S.l.], v. 35, p. 322-333, 2013.

HILLMAN, R. S.; AULT, K. A.; RINDER, H. M. **Hématologie en pratique clinique**: guide de diagnostic et de traitement. [S.l.]: Médecine-Sciences Flammarion, 2007.

KASPER, C. K. **Diagnosis and management of inhibitors to factor VIII and IX**. Montréal: World Federation of Hemophilia, 2004. (Treatment of Hemophilia, n. 34).

KEY, N. S. Inhibitors in congenital coagulation disorders. **British Journal of Haematology**, [S.l.], v. 127, n. 4, p. 379-391, 2004.

KITCHEN, S. et al. Lipid composition of seven APTT reagents in relation to heparin sensitivity. **British Journal of Haematology**, [S.l.], v. 106, n. 3, p. 801-808, 1999.

KITCHENS, C. S.; KESSLER, A. B; KONKLE, C. M. **Consultative Hemostasis and Thrombosis**. Philadelphia: W B Saunders Company, 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**, [S.l.], v. 97, n. 6, p. 457-462, 2000.

LILLICRAP, D. **The Basic science, diagnosis, and clinical management of von Willebrand disease**. Montréal: World Federation of Hemophilia, 2008. (Treatment of Hemophilia; n. 35).

_____ ; JAMES, P. **Von Willebrand disease**: an introduction for the primary care physician. Montréal: World Federation of Hemophilia, 2009. (Treatment of Hemophilia; n. 47).

MACFARLANE, D. E. et al. A method for assaying von Willebrand factor (ristocetin cofactor). **Thrombosis et Diathesis Haemorrhagica**, [S.l.], v. 34, p. 306-308, 1975.

MANI, H. Use of native or platelet count adjusted platelet rich plasma for platelet aggregation measurements. **Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 48, p. 747-750, 2005.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. **HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. 22nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007.

MICHELSON, A. D. Methods for the measurement of platelet function. **The American Journal of Cardiology**, [S.l.], v. 103, p. 20A-26B, 2009.

NGERSLEV, J. A sensitive ELISA for von Willebrand factor (vWf:Ag). **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, [S.l.], v. 47, n. 2, p. 143-149, 1987.

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**, [S.l.], v. 14, n. 2, p. 171-232, 2008.

RAO, A. Inherited platelet function disorders overview and disorders of granules, secretion, and signal transduction. **Hematology/Oncology Clinics of North American**, [S.l.], v. 27, p. 585-611, 2013.

SAMPOL, J. **Manuel d'Hémostase**. [S.l.]: Elsevier Masson, 1995.

SHARATHKUMAR, A. A.; SHAPIRO, A. **Platelet function disorders**. 2nd ed. Montréal: World Federation of Hemophilia, 2008. (Treatment of Hemophilia; n. 19).

SILVA, S. 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.

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**, [S.l.], v. 88, n. 2, p. 362-364, 2002.

_____. et al. Diagnosis of factor VIII deficiency. **Haemophilia**, [S.l.], v. 14, n. s3, p. 76-82, 2008.

_____. et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. **Thrombosis and Haemostasis**, [S.l.], v. 73, n. 2, p. 247-251, 1995.

_____. 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**, [S.l.], v. 86, n. 6, p. 1435-1439, 2001.

ZHOU, L. H. Schmaier Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. **American Journal of Clinical Pathology**, [S.l.], v. 123, n. 2, p. 172-183, 2005

ISBN 978-85-334-2427-2



9 788533 424272

DISQUE SAÚDE

136

Ovidoria Geral do SUS
www.saude.gov.br

Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde
www.saude.gov.br/bvs



MINISTÉRIO DA
SAÚDE

