

Diagnóstico de Hemofilia e Outros Distúrbios Hemorrágicos: Manual de Laboratório

Terceira edição

Editado por

Silmara de Lima Montalvão, Farmacêutica, MSc, PhD

CHEFE DE DIAGNÓSTICO E PESQUISA LABORATORIAL EM HEMOSTASIA, Diretora Científica, Programa de Avaliação Externa de Qualidade (PAEQ-Hemostasia) Nacional do Brasil para Coagulação Sanguínea, Hemocentro, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, São Paulo, Brasil

Steve Kitchen, PhD

CIENTISTA CLÍNICO, Sheffield Hemophilia and Thrombosis Centre, Royal Hallamshire Hospital Sheffield; e Diretor Científico, Programa de Avaliação Externa de Qualidade (NEQAS) Nacional do Reino Unido para Coagulação Sanguínea, Diretor Científico, Avaliação Externa de Qualidade Internacional da WFH e OMS

Publicado pela Federação Mundial de Hemofilia (WFH)

© World Federation of Hemophilia, 2025

A WFH incentiva a redistribuição de suas publicações para fins educacionais por organizações sem fins lucrativos de hemofilia. Para obter permissão para reproduzir ou traduzir este documento, entre em contato com o Departamento de Comunicações no endereço abaixo.

Esta publicação pode ser acessada no site da Federação Mundial de Hemofilia em www.wfh.org. Cópias adicionais também são disponibilizadas pela WFH em:

World Federation of Hemophilia
1184 rue Sainte-Catherine Ouest
Bureau 500
Montreal, Quebec H3B 1K1 Canadá
Tel.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916
e-mail: wfh@wfh.org

www.wfh.org

Índice

PARTE 1	Planejamento Geral da Qualidade no Laboratório de Hemostasia	<i>Pierre Toulon</i>	3
PARTE 2	Validação, Intervalos de Referência e Desempenho de Testes de Hemostasia	<i>Silmara Montalvão</i> ...	14
PARTE 3	Integridade das Amostras e Variáveis Pré-Analíticas	<i>Kieron Hickey</i>	21
PARTE 4	Investigação Laboratorial Utilizando Apenas Testes Manuais	<i>Steve Kitchen</i>	25
PARTE 5	Avaliação Inicial de Hemostasia	<i>Anastasia Khasiani</i>	32
PARTE 6	Investigação Laboratorial de Hemofilia	<i>Annette Bowyer</i>	47
PARTE 7	Deteção e Quantificação de Inibidores Funcionais Congênitos e Adquiridos na Hemostasia	<i>Silmara Montalvão</i>	64
PARTE 8	Investigação Laboratorial de Doença de Von Willebrand, Tulasi Geevar Nitty S. Mathews e Annette . Bowyer		71
PARTE 9	Investigação Laboratorial de Outros Fatores de Coagulação	<i>Annette Bowyer</i>	106
PARTE 10	Plaquetas	<i>Tulasi Geevar</i>	113
PARTE 11	Investigação Laboratorial de Síndrome do Anticorpo Antifosfolípideo (SAF)	<i>Silmara Montalvão</i> ..	131
PARTE 12	Investigação Laboratorial de Fibrinólise	<i>Silmara Montalvão</i>	136
PARTE 13	Parâmetros de Coagulação em Populações Pediátricas	<i>Pierre Toulon</i>	139
PARTE 14	Análise Genética Molecular	<i>Carlos De Brasi e Megan Sutherland</i>	143
PARTE 15	Resolução de Problemas com Testes Laboratoriais de Coagulação	<i>Steve Kitchen</i>	153

Colaboradores

Anastasia Khasiani, Clinisys Associates Ltd., Atlanta, Geórgia, EUA

Annette Bowyer, Departamento de Coagulação, Sheffield Teaching Hospitals NHS Foundation Trust, Sheffield, Reino Unido

Carlos De Brasi, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), CONICET-Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina

Megan Sutherland, North West Genomic Laboratory Hub, Manchester University NHS Foundation Trust, Manchester, Reino Unido

Nitty Mathews, Christian Medical College, Vellore, Índia

Pierre Toulon, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Université Nice-Côte d'Azur, França

Tulasi Geevar, Christian Medical College, Vellore, Índia

TÓPICOS ABORDADOS

- | | |
|---|--|
| ✓ Controle de Substâncias Potencialmente Perigosas para a Saúde | ✓ Medidas de Segurança – Precauções Universais |
| ✓ Segurança em Laboratório | ✓ Equipamento Geral de Laboratório |
| ✓ Responsáveis pela Segurança | ✓ Metrologia |
| ✓ Manual de Segurança | ✓ Avaliação e Uso de Coagulômetros |
| | ✓ Reagentes |
-

Controle de Substâncias Potencialmente Perigosas à Saúde: a norma EN ISO 15189 especifica os requisitos de qualidade e competência específicos para laboratórios de análises de biologia médica. A ISO 15189 destina-se a ser utilizada em todas as disciplinas praticadas por laboratórios médicos. Sua aplicação é, portanto, fundamental para os laboratórios, pois seus serviços devem atender às necessidades tanto dos pacientes quanto dos médicos responsáveis pelos cuidados prestados aos seus pacientes. Esses serviços incluem requisitos de processamento, preparação e identificação de pacientes, coleta, transporte, armazenamento, pré-processamento e análise de amostras, seguidos pela validação dos resultados, sua interpretação, relato e aconselhamento, garantindo a segurança da equipe e o respeito à ética.

Segurança em Laboratório: laboratórios que manipulam produtos químicos e amostras biológicas são locais potencialmente perigosos. Nos últimos anos, tem havido uma crescente valorização da importância de práticas de trabalho seguro na área, por motivos de saúde e ambientais. Essa conscientização levou a uma maior ênfase em questões como documentação de segurança, treinamento de pessoal e avaliação de riscos. Os empregadores têm a responsabilidade de fornecer as roupas e equipamentos de proteção necessários e são obrigados a oferecer treinamento em práticas de trabalho seguro. A implementação dessas práticas de trabalho seguro deve reduzir significativamente a probabilidade de lesões graves para você, seus colegas e membros do público.

Responsáveis pela Segurança: é importante instituir um ou mais responsáveis pela segurança para cada departamento. Essas pessoas assumirão as responsabilidades de introduzir e manter os procedimentos de segurança. No entanto, a segurança é responsabilidade de toda a equipe do laboratório.

Manual de Segurança: deve haver um manual de segurança abrangente que aborde todos os aspectos das práticas de trabalho seguro para todo o departamento. Todos os funcionários devem ler o manual e assinar uma declaração indicando que o compreenderam. Cópias devem ser mantidas com os responsáveis pela segurança e também disponibilizadas em locais de fácil acesso a todos os funcionários, seja em formato impresso ou, de preferência, eletrônico, para garantir que a versão mais recente esteja disponível.

Medidas de Segurança – Precauções Universais: o sistema de precauções universais exige que qualquer perigo de infecção proveniente de qualquer origem seja evitado ou minimizado por meio de boas práticas de trabalho. Deve-se considerar que todas as amostras de sangue, hemoderivados (incluindo kits e reagentes à base de plasma) e outros materiais do corpo humano apresentam possível perigo de infecção. As medidas de proteção mais completas possíveis devem ser sempre adotadas ao trabalhar com qualquer material. Nenhuma outra classificação de risco deve ser feita. Todos os materiais e fluidos corporais diferentes de sangue, coletados ou trazidos à unidade para testes ou qualquer outra finalidade, devem ser manuseados com o mesmo cuidado dispensado ao sangue.

O laboratório: o laboratório deve estar sempre limpo e organizado. A documentação deve ser mantida separada das áreas de testes do laboratório. Evite usar o laboratório para armazenar itens a granel. Certifique-se de que todos participem da manutenção da ordem no laboratório.

Roupas de proteção: todos que entrarem no laboratório, incluindo visitantes, devem usar um jaleco. Caso seja contaminado, o jaleco deve ser trocado imediatamente.

Luvas descartáveis: embora muitas pessoas não gostem de usar luvas, recomenda-se o uso de luvas descartáveis de látex ou poliacrilamida, visto que todas as amostras manuseadas no laboratório são potencialmente perigosas. Luvas devem ser sempre usadas ao manusear materiais tóxicos. Luvas e jalecos obviamente não protegem contra acidentes com agulhas, mas evitam, por exemplo, cortes ou abrasões na pele que entra em contato com soro ou plasma positivo para HIV. É obrigatório sempre substituir as luvas imediatamente caso estejam rasgadas ou sejam perfuradas.

Lavagem dos olhos: lave os olhos imediatamente com bastante água fria corrente caso tenha ocorrido contato com algum material possivelmente infeccioso, pois muitas infecções podem ser facilmente adquiridas pelo contato com as mucosas dos olhos.

Perfurocortantes: perfurocortantes, como agulhas e cacos de vidro, representam grande perigo. Use uma caixa para objetos perfurocortantes capaz de conter esses objetos sem ser perfurada. Já houve casos de trabalhadores infectados em decorrência de ferimentos com agulhas.

Aerossóis: evite todas as práticas em laboratório aberto que possam causar respingos ou liberação de gotículas ou poeira no ar. Operações que gerem aerossóis devem ser sempre realizadas em capela de exaustão adequada, com uso de óculos de segurança. Todos os derramamentos devem ser limpos imediatamente, utilizando água sanitária ou um agente neutralizante, conforme necessário.

Substâncias tóxicas e inflamáveis: materiais tóxicos ou inflamáveis devem sempre ser contidos em capela de exaustão ou caixa segura adequada.

Equipamento elétrico: tenha cuidado especial com qualquer equipamento que utilize líquidos, como tanques de eletroforese e banhos-maria. Sempre deixe a instalação, a manutenção e os reparos a cargo de pessoal qualificado.

Pertences pessoais e comportamento: nunca leve itens pessoais, como canetas, bolsas e pentes, para o laboratório. Evite o contato das mãos com o rosto ou mucosas (olhos, nariz e boca) enquanto estiver no laboratório, mas, se for realmente necessário, lave sempre as mãos antes. Lave sempre bem as mãos antes de sair do laboratório. Nunca coloque uma pipeta na boca. Alimentos, cigarros e cosméticos nunca devem ser trazidos para o laboratório. Isso significa que comer, beber e fumar devem ser evitados no laboratório.

Acidentes: Todos os acidentes devem ser relatados imediatamente e registrados no livro de acidentes mantido pelo Responsável pela Segurança da unidade. Isso é particularmente importante em relação a ferimentos por agulhas. Nessas situações, siga os sistemas de registro e relato de hospitais locais, juntamente com quaisquer ações localmente recomendadas ou obrigatórias.

Controle de Substâncias Potencialmente Perigosas à Saúde: os laboratórios devem cumprir a regulamentação local, que geralmente publica guias úteis na identificação de riscos e perigos, como o Controle de Substâncias Perigosas à Saúde (COSHH) em laboratórios do Reino Unido.

Perigo e risco: o perigo apresentado por uma substância é o seu potencial de causar danos. O risco dessa substância é a probabilidade de causar danos a alguém nas condições reais de uso.

Identificação de perigos: a identificação de perigos é um pré-requisito essencial da avaliação de riscos. O tempo gasto na identificação dos perigos varia de acordo com a substância.

Avaliação de riscos: considere os seguintes fatos:

- Perigos
- Condições de uso
- Quantidades a serem utilizadas
- Prováveis vias ou locais de exposição (inalação, ingestão, pele ou olhos)

O resultado da avaliação de riscos determinará:

- Condições de armazenamento
- Procedimentos de manuseio
- Procedimentos de descarte
- Necessidade de monitoramento e vigilância sanitária
- Procedimentos de emergência

A avaliação de riscos deve ser revisada anualmente e atualizada, se necessário. Um exemplo de como registrar informações para avaliações de riscos, por meio do procedimento COSHH utilizado em laboratórios do Reino Unido, é apresentado na Tabela 1. O objetivo desses formulários é identificar os perigos e as medidas de controle associados aos equipamentos utilizados em um procedimento específico. Somente pessoal documentado como competente deve realizar qualquer procedimento, e deve realizá-lo somente após revisar a documentação de saúde e segurança relacionada ao teste específico.

Tabela 1. Controle de substâncias potencialmente perigosas à saúde (COSHH) para ensaios de fator de coagulação (F) baseado no TTPA e tempo de protrombina

Nº ref. COSHH ensaios 1		Ensaios de coagulação de um estágio de lab. ref. para FII, FV, FVIII, FVIII, FIX, FX, FXI e FXII
Título do procedimento/experimento:		
Substância	Quantidade aproximada	Perigo identificado
Tampão glicoxalina (imidazol), contém (vide**)	<5 mL	Nocivo se ingerido.
**Imidazol	3,4 g/L	Corrosivo: provoca queimaduras. Nocivo se inalado, ingerido ou absorvido pela pele. Irritante para os olhos.
**Cloreto de sódio	5,85 g/L	Irritante para os olhos e pulmões. Evite contato com a pele.
Plasma deficiente em fator	1 mL	Risco de infecção.
Tromboplastina	2 mL	Risco baixo.
Reagente de TTPA	2 mL	Risco baixo.
Cloreto de cálcio 0,025 M	5 mL	Risco baixo.
Tampão de Owren	<500 mL	Contém barbitona. Nocivo se ingerido. Pode causar sensibilização por contato com a pele ou inalação.
Solução de lavagem 1 do analisador de coagulação	<50 mL	Provoca queimaduras: nocivo aos olhos, pele, etc. Não misture com outros desinfetantes. Corrosivo. O contato com materiais combustíveis pode causar incêndio. O contato com ácido libera gases tóxicos. Reage violentamente com sais de amônio; solvente orgânico - risco de explosão.
Solução de lavagem 2 do analisador de coagulação	<50 mL	Contém 0,16% de ácido clorídrico e detergente. Irritante: pode causar danos aos olhos e à pele.
Plasma padrão/de controle/paciente	<1000 µL	Risco de infecção.

Equipamento Geral de Laboratório: qualquer laboratório envolvido no diagnóstico e no monitoramento do tratamento de distúrbios hemorrágicos que utilize algumas ou todas as técnicas descritas neste manual exigirá um mínimo de equipamento básico.

Equipamento geral: os requisitos de equipamentos básicos são:

- 1) Refrigerador a 4°C para armazenamento de reagentes. Os reagentes devem normalmente ser mantidos entre 2 e 8°C, salvo indicação em contrário do fabricante. Uma unidade doméstica de boa qualidade pode ser adequada.
- 2) Freezer capaz de manter pelo menos -20°C (preferivelmente -35°C). Uma temperatura mais baixa, como -70°C, é útil para armazenamento mais prolongado, pois os fatores de coagulação permanecem estáveis nessa temperatura por pelo menos 6 meses. Freezers com ciclo de descongelamento automático são completamente inadequados.
- 3) Banhos-maria regulados capazes de manter temperaturas de $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$. A temperatura normalmente é melhor mantida em banho-maria do que em blocos aquecedores secos, que podem ou não ser adequados, dependendo da unidade.
- 4) Medidor de pH.
- 5) Uma fonte de luz.
- 6) Cronômetro(s).
- 7) Pipetas automáticas calibradas, capazes de fornecer volumes exatos e precisos de amostra e reagente na faixa de 0 µL–200 µL e até 1000 µL. É importante verificar a exatidão dessas pipetas regularmente.
- 8) Pipeta calibrada para dispensação de volumes de líquido até 5 mL.
- 9) Centrífuga capaz de gerar pelo menos 1700 g, preferivelmente de 2200 a 2500 g. Para a maioria das análises de coagulação, centrifugação em temperatura ambiente (20–25°C) é aceitável, embora centrifugação a 4°C seja recomendada em algumas técnicas.
- 10) Balança analítica calibrada capaz de medir com exatidão gramas com até três casas decimais.

Alguns procedimentos requerem equipamentos adicionais, incluindo:

- 11) Analisador de coagulação (coagulômetro).
- 12) Leitor de microplacas para ensaios imunoenzimáticos (ELISAs).
- 13) Agregômetro de plaquetas. Equipamento especificado em fichas de métodos específicos.

Ar condicionado em cada ambiente é uma grande vantagem em países com altas temperaturas.

Deve haver um suprimento adequado de consumíveis. A reutilização de tubos de ensaio e ponteiros de pipeta após lavagem deve ser evitada, pois resíduos podem afetar de maneira adversa os resultados, causando desperdício de reagentes e tempo. O mesmo se aplica aos tubos de coleta, que são projetados para uso único e não devem ser reutilizados mesmo após lavagem extensa.

Metrologia: para auxiliar na gestão da qualidade, as calibrações de balança e volume de pipetas devem ser verificadas regularmente, por exemplo, a cada 3–6 meses. Aparelhos significativamente descalibrados devem ser imediatamente retirados de uso até que a recalibração seja realizada. Todas as pipetas devem ter um identificador exclusivo.

Método de verificação da calibração de pipetas: as pipetas podem ser para um único volume, para dois ou três volumes, ou ter uma faixa contínua de volumes.

- Pipetas com uma ou duas configurações fixas são verificadas em cada configuração.
- Pipetas com três configurações fixas são verificadas nas configurações mínima e máxima.
- Pipetas com configurações de faixa contínua de volume: verifique a configuração máxima, bem como um volume em torno de 25% da configuração máxima. Ou seja:
 - Pipeta de 10 mL – 10 mL e 2,5 mL
 - Pipeta de 5 mL – 5 mL e 1,25 mL
 - Pipeta de 1 mL – 1 mL (1000 µL) e 0,25 mL (250 µL)

- Pipeta de 0,2 mL – 0,2 mL (200 µL) e 0,05 mL (50 µL)
- Pipeta de 0,1 mL – 0,1 mL (100 µL) e 0,025 mL (25 µL)
- Pipeta de 50 µL – 50 µL e 15 µL

Verifique a calibração pesando cinco volumes replicados de água destilada (em temperatura ambiente) em uma balança. Cada peso é registrado em gramas (com três casas decimais). Para fins práticos, 1,000 mL de água destilada pesa 1,000 g.

Os resultados e quaisquer medidas adotadas devem ser registrados. As pipetas devem, preferivelmente, ter exatidão significativa em menos de 10% (veja os exemplos abaixo). Quando uma pipeta for inexata porque o volume médio pipetado difere em mais de 10% do volume indicado, ela deve ser imediatamente retirada de uso e não utilizada até ser recalibrada de acordo com as instruções do fabricante.

Observação: se uma pipeta apresentar imprecisão além dos seguintes limites (peso médio), ela deverá ser retirada de uso imediatamente.

Pipeta de 10 mL

10 mL: 9,000 – 11,000 g
2,5 mL: 2,250 – 2,750 g

Pipeta de 5 mL

5 mL: 4,500 – 5,500 g
1,25 mL: 1,125 – 1,375 g

Pipeta de 1 mL

1 mL: 0,900 – 1,100 g
0,25 mL: 0,225 – 0,275 g

Pipeta de 0,2 mL

0,2 mL: 0,180 – 0,220 g
0,05 mL: 0,045 – 0,055 g

Pipeta de 0,1 mL

0,1 mL: 0,090 – 0,110 g
0,25 mL: 0,225 – 0,275 g

Pipeta de 50 µL

50 µL: 0,045 – 0,055 g
15 µL: 0,013 – 0,165 g

Para obter informações adicionais, consulte o documento ISO 8655-2-2002, disponível em diferentes idiomas.

Método de verificação de balanças: para garantir sua exatidão, pesos calibrados são pesados em intervalos de seis meses e os valores são registrados.

- 1) Zere a balança.
- 2) Pese três pesos calibrados, um de cada vez. Registre os pesos com três casas decimais (por exemplo, 1,003 g).
- 3) Se algum peso estiver fora dos limites estabelecidos (em >2%), retire-a de uso até que o problema seja corrigido.

Método de verificação da temperatura de compartimentos refrigerados: a temperatura interna dos refrigeradores deve ser mantida a +4°C (geralmente na faixa de +2°C a +7°C) usando uma sonda de temperatura, e de maneira ideal deve ser registrada constantemente, seja por meio de um disco impresso local ou eletronicamente. O mesmo se aplica aos freezers, que devem ser mantidos em temperaturas de -20°C, -35°C ou até abaixo de -70°C.

Avaliação e Uso de Coagulômetros: a automação em laboratórios de coagulação é hoje amplamente utilizada na maior parte do mundo. Ela contribuiu para melhorias na padronização e na facilitação de testes que exigem treinamento específico e condições especiais de trabalho, permitindo que os laboratórios aprimorem sua eficiência e repertório. A automação em hemostasia é relativamente recente. Métodos manuais baseados na detecção visual do coágulo de fibrina e no uso de incubadoras a 37°C eram, no passado, as únicas técnicas para estudos de coagulação. Então, na década de 1970, surgiram novos equipamentos semiautomáticos baseados em princípios fotométricos ou mecânicos para detectar coágulos de fibrina. Mais recentemente, instrumentos totalmente automatizados se tornaram comuns em laboratórios modernos. Novos equipamentos conectados a sistemas de informação laboratorial, geralmente incluindo sistemas específicos de processamento de dados, podem realizar testes de coagulação, cromogênicos e imunológicos.

Duas metodologias principais baseadas em sistemas de detecção mecânicos e ópticos estão disponíveis atualmente. Os sistemas mecânicos permitem apenas a realização de ensaios de coagulação, enquanto os sistemas ópticos permitem a realização de ensaios cronométricos, cromogênicos e imunológicos baseados em princípios foto-ópticos, nefelométricos, cromogênicos e imunológicos. Além disso, analisadores baseados em fluorescência e quimioluminescência estão sendo disponibilizados no mercado, permitindo a realização de ensaios específicos com uma ampla gama de medições.

Princípio mecânico: os métodos eletromagnéticos baseiam-se na detecção de um aumento na viscosidade do plasma durante a formação de fibrina. Duas variações desse princípio são aplicadas atualmente aos equipamentos de laboratório.

A primeira utiliza um campo eletromagnético aplicado a cubetas de teste que detecta movimento dentro de uma esfera de aço inoxidável colocada na amostra de plasma. A esfera de aço segue um movimento pendular, oscilando de um lado para o outro em uma solução reagente de plasma com movimento constante. À medida que a fibrina começa a se formar, a viscosidade aumenta e o movimento da esfera é retardado. Quando o movimento de oscilação da esfera atinge um nível predeterminado, o cronômetro para, indicando o tempo de coagulação do plasma.

Um segundo método de detecção mecânico também utiliza uma esfera de aço inoxidável, dessa vez localizada em uma única ranhura. Um sensor magnético detecta a posição da esfera e, à medida que gira, ela mantém sua inclinação enquanto a amostra líquida permanece fluida. Quando a fibrina é formada, o coágulo captura a esfera, movendo-a de sua posição original. À medida que ela se move para fora do alcance do sensor, o circuito é interrompido e o cronômetro para.

Princípios ópticos ou espectrofotométricos:

Princípio foto-óptico: os sistemas ópticos baseiam-se na noção de que a formação de coágulo induz alterações na densidade óptica do plasma. À medida que o coágulo se forma, ocorrem alterações nas características ópticas em relação à leitura inicial do plasma/dos reagentes. Essas alterações são monitoradas e utilizadas para determinar o tempo necessário para que um determinado grau de alteração ocorra.

Princípio nefelométrico: o princípio nefelométrico é utilizado por alguns sistemas. Em ensaios de coagulação, uma fonte de luz laser monocromática é transmitida, por exemplo, por fibra óptica. É possível fazer as leituras de dispersão de luz por um sensor que pode ser instalado a 90 ou 180 graus da trajetória da luz, dependendo do sistema, que então mede a luz espalhada em um ângulo ou registra a alteração na transmissão de luz. Quando a luz atinge complexos insolúveis, como fibras de fibrina, ela se dispersa em ângulos de espalhamento frontal (180 graus) e ângulos de espalhamento lateral (90 graus). O cronômetro para quando a quantidade de luz espalhada ou de luz transmitida atinge um nível predeterminado específico. A diferença entre a luz espalhada ou transmitida antes e depois da formação do coágulo é normalmente proporcional à quantidade de fibrina formada.

Princípio cromogênico: baseia-se no uso de uma substância geradora de cor específica, conhecida como cromóforo, sendo a para-nitroanilina (pNA) a mais comum. Sua absorbância máxima é de 405 nm. O princípio do teste cromogênico reside na aderência de pNA a substratos sintéticos. A pNA é ligada a uma série de aminoácidos que imitam a sequência-alvo do fator de coagulação ativado que queremos determinar. A proteína de coagulação cliva o substrato cromogênico em um sítio específico entre uma sequência de aminoácidos definida e libera a pNA. A intensidade da cor amarela é proporcional à quantidade de pNA liberada. Isso é medido por fotodetecção no comprimento de onda de 405 nm. À medida que mais pNA é clivada e liberada, a capacidade de absorbância da amostra aumenta, o que ocasiona uma maior alteração na densidade óptica da solução. Os primeiros equipamentos de coagulação forneciam apenas um único parâmetro de definição, como um parâmetro mecânico ou foto-óptico. As ferramentas foto-ópticas foram inicialmente projetadas para leitura em um único comprimento de onda (por exemplo, 500 nm ou 600 nm), que só podia ser usado para a detecção da formação de coágulo. Mais recentemente, alguns coagulômetros podem ler em dois ou mais comprimentos de onda, frequentemente incluindo 405 nm, aumentando assim a capacidade para reações mais recentes (métodos de substrato cromogênico). Na década de 1990, vários fabricantes incluíram com sucesso diversos métodos

de detecção, que agora oferecem a um único laboratório a possibilidade de usar o mesmo equipamento para diferentes metodologias.

Princípio imunológico: micropartículas de látex revestidas com um anticorpo específico são geralmente utilizadas contra o analito (antígeno) a ser medido. Um feixe de luz monocromática atravessa a suspensão de micropartículas de látex. Quando o comprimento de onda é maior que o diâmetro das partículas em suspensão, as partículas absorvem uma pequena quantidade de luz. No entanto, quando as micropartículas de látex revestidas com o antígeno específico entram em contato com o antígeno presente na solução, elas aderem ao anticorpo, formando ligações entre as partículas, o que produz aglutinação. Quando o diâmetro das partículas se aproxima do comprimento de onda do feixe de luz monocromática, uma maior quantidade de luz é absorvida. Esse aumento na absorbância da luz é proporcional à aglutinação, que, por sua vez, é proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra. Esse tipo de tecnologia está disponível em analisadores de coagulação mais sofisticados, introduzidos no mercado na década de 1990. Ensaios imunológicos padrão, geralmente demorados, podem ser realizados em minutos com o uso de qualquer uma dessas ferramentas automatizadas.

Tabela 2. Vantagens e desvantagens dos métodos de detecção na definição de parâmetros

Método	Vantagens	Desvantagens
Mecânico	Nenhuma interferência causada por características físicas, como lipemia ou icterícia Pode utilizar pequenos volumes de amostra	Impossível observar gráficos de formação de coágulos Pode apresentar problemas de detecção de ponto final em algumas amostras com baixo nível de fibrinogênio
Foto-óptico	Possibilidade de gráficos sobre formação de coágulos Verificações ópticas de hemólise/lipemia/icterícia em alguns sistemas ópticos Pode utilizar pequenos volumes de amostra	Interferência causada por lipemia, hemólise, hiperbilirrubinemia ou aumento de proteínas em alguns sistemas Alguns sistemas podem apresentar dificuldades na detecção de coágulos ao utilizar reagentes completamente transparentes Períodos de coagulação muito curtos podem passar despercebidos devido ao atraso antes do início do monitoramento
Nefelométrico	Pode medir reações antígeno-anticorpo em proteínas presentes em quantidades muito pequenas	Limita o número de testes disponíveis Custo dos reagentes
Cromogênico	Ensaios totalmente específicos podem ser mais fáceis Parâmetros adicionais não adequados para medição por detecção de coágulos podem ser possíveis Aumenta o repertório de testes possíveis Possíveis melhorias na precisão em comparação com análises baseadas em coágulos	Limitado pelo comprimento de onda do instrumento Requer grandes volumes de teste para uma relação custo-benefício positiva Custo dos instrumentos e reagentes
Imunológico	Pode automatizar métodos manuais e demorados Aumenta o número de testes possíveis	Número limitado de testes disponíveis Custo dos instrumentos Custo dos reagentes

Vantagens da automação no laboratório de coagulação:

- 1) Melhora a capacidade e a flexibilidade do tempo profissional despendido (Rodak, 1995).
- 2) Melhora o desempenho dos testes. No passado, os testes manuais de coagulação eram inexatos, com coeficientes de variação acima de 20%; os equipamentos semiautomáticos proporcionavam maior exatidão nos testes de coagulação. Entretanto, com o envio manual de amostras e reagentes, os testes tinham que ser realizados em duplicata. Com equipamentos totalmente automatizados, a exatidão melhorou, atingindo coeficientes de variação

abaixo de 5% e até mesmo 1% para alguns testes. Isso fez com que os autores introduzissem a noção de testes únicos e a possibilidade de reduzir os custos de reagentes e cubetas pela metade.

- 3) Reduz o custo com amostras e reagentes, permitindo o uso de volumes menores de plasma e reagentes (pelo menos a metade).
- 4) Facilita os sistemas de armazenamento e recuperação de dados por meio de programas de computador.
- 5) Permite a reprodução automática dos resultados em caso de erros na primeira execução.
- 6) Oferece a possibilidade de realizar diferentes testes usando uma única amostra.
- 7) Permite a coleta de amostras de um tubo fechado (denominada “cap-piercing”), o que melhora a segurança e a eficiência nos testes de coagulação. Isso reduz, em grande parte, a possibilidade de exposição do operador a borrifos ou derramamentos de amostras de pacientes ou erros de rotulagem. Curiosamente, um fabricante ofereceu um sistema de triagem patenteado que separa automaticamente o plasma dos eritrócitos antes dos testes, sem centrifugação prévia.
- 8) Oferece a capacidade de diluir amostras, calibradores e controles. O equipamento pode ser programado para diluições adicionais caso os resultados iniciais escapem da linearidade do método. Também pode realizar outros testes automaticamente, sem a intervenção do operador, se houver indicação clínica ou em função dos resultados da execução inicial.
- 9) A maioria dos analisadores inclui sistemas de alarme que avisam o operador sobre leituras acima dos limites preestabelecidos, o que pode identificar problemas no equipamento (por exemplo, pequena quantidade de reagente, falha de temperatura, volume de amostra muito pequeno e erros de controle de qualidade), bem como erros pré-analíticos (tubos subpreenchidos, hemólise, icterícia, lipemia e presença de coágulos).

Os diferentes tipos metodológicos disponíveis possuem vantagens e desvantagens que devem ser conhecidas e compreendidas para garantir a precisão e a validade dos resultados dos testes. É importante considerar que os laboratórios são responsáveis pela confiabilidade dos resultados. A principal preocupação de um laboratório é selecionar o equipamento de coagulação que gerará resultados adequados, apesar das restrições orçamentárias. Esses instrumentos exigem manutenção técnica regular, conhecimento permanente e controle do sistema, uma vez que qualquer erro ou falha pode influenciar decisivamente uma série de resultados. Sistemas de controle que garantam a confiança analítica são, portanto, obrigatórios.

Muitos laboratórios podem ter a sorte de poder avaliar os equipamentos antes da compra. Caso isso não seja possível, é muito importante obter informações e aconselhamento adequados de um laboratório de referência, além da revisão da literatura.

Ao avaliar novos equipamentos antes da compra, compare primeiro os analisadores de acordo com critérios como:

- custos de equipamento e manutenção
- período de inatividade e confiabilidade
- tempo de resposta ao reparo
- facilidade de uso
- disponibilidade de manutenção adequada dentro de prazo apropriado
- processo de validação e produtividade
- custo de elementos descartáveis
- flexibilidade no uso de reagentes de outros fabricantes
- possibilidade de adicionar novos protocolos de teste
- capacidade e custo de conexão com o sistema de informações do laboratório
- cursos de treinamento e suporte de treinamento contínuo

A sensibilidade de diferentes tipos de equipamentos a diversos parâmetros varia dependendo de como as máquinas são calibradas e de como os pontos finais são detectados. Os laboratórios têm necessidades diferentes, e é aconselhável classificar as prioridades. Por exemplo, consulte a Tabela 3.

Tabela 3. Características de equipamentos especializados (adaptado de Rodak, 1995)

Características	Descrição
Acesso randômico	Com a amostra de pacientes, vários testes diferentes são possíveis em qualquer ordem e ao mesmo tempo.
Tubo primário de amostra	A amostra de plasma é coletada diretamente por aspiração em um tubo de coleta aberto colocado no analisador.
Rolha penetrante e tubo de amostra fechado	O analisador aspira a amostra de plasma dentro do tubo de coleta com a rolha de borracha no lugar.
Código de barras	Permite a identificação de reagentes, amostras de pacientes ou ambos por meio de um código de barras. Isso reduz a entrada manual de dados.
Interfase bidirecional	O analisador consulta um computador centralizado para determinar o número de testes solicitados. O operador não precisa programar manualmente as informações no equipamento.
Indicador de amostra	Avisa o operador sobre problemas com a integridade da amostra.
Sensor de nível de líquido	Avisa o operador sobre volume insuficiente de amostra ou reagente para teste adequado, ou se o equipamento não aspirou o suficiente da amostra para realizar o teste solicitado.
Programas integrados de controle de qualidade	O programa de computador do instrumento armazena e organiza dados de controle de qualidade. Pode incluir a aplicação completa das regras de Westgard para indicar resultados fora dos limites.
Capacidades de STAT	Permite que o operador cancele a sequência de verificação do teste para colocar uma nova amostra de STAT na ilha de verificação.
Capacidade de refrigeração de amostras integradas	Preserva a integridade de amostras, reagentes ou ambos durante o processo de verificação.
Capacidade de armazenamento de amostras integradas	Indica a quantidade de amostra do paciente que pode ser carregada no analisador a qualquer momento.
Capacidade de teste de reflexo	Permite programar o equipamento para repetir ou adicionar testes de acordo com parâmetros específicos definidos pelo operador.
Armazenamento de dados de pacientes	Capacidade do analisador de armazenar resultados de testes que podem ser recuperados a qualquer momento. Pode armazenar curvas de formação de coágulos.
Monitoramento do volume de reagente	Avisa o operador sobre reagente insuficiente para testes programados.
Processamento	Número de testes que podem ser processados dentro de um determinado período (geralmente classificado como número de testes por hora).
Curva de formação de coágulos	Permite que o operador visualize a formação de coágulos dentro da cubeta. Ajuda a detectar certas condições anormais ou estados mórbidos, ou a localização e solução de falhas em resultados de testes divergentes.
Verificações pré-analíticas	Deteção de tubos subpreenchidos, hemólise, icterícia, lipemia, coágulo.

A tecnologia está em ascensão e as crescentes demandas diárias geram a necessidade de instrumentos dessa natureza no laboratório. Eles representarão um grande avanço na área laboratorial em razão da possibilidade de realizar testes de forma confiável, exata e precisa, e fornecer resultados mais rapidamente (menor tempo de resposta) e com melhor controle. As vantagens da automação são inúmeras. A tecnologia avança continuamente para acompanhar os novos desenvolvimentos na área e reduzir os tempos de resposta, permitindo que os testes sejam confiáveis, exatos e precisos e mantendo a qualidade.

Reagentes: além de reagentes específicos para ensaios específicos, que serão detalhados nos capítulos correspondentes, alguns reagentes são amplamente utilizados no laboratório de hemostasia (por exemplo, solução de cloreto de cálcio e diversos tampões). Eles podem ser adquiridos de fabricantes de reagentes ou preparados localmente a partir de reagentes a granel ou soluções concentradas.

Solução de cloreto de cálcio 25 mM: por exemplo, se for adquirida uma solução molar, para obter uma solução 25 mM, dilua 25 mL de solução 1 M para 1 litro em balão volumétrico com água destilada.

Tampões:

- Tampão barbitúrico de Owren pH 7,35

Pese 5,875 g de dietilbarbitúrico de sódio (barbitona sódica) e 7,335 g de cloreto de sódio.

Coloque em um balão volumétrico e dissolva em aproximadamente 780 mL de água destilada.

Adicione 215 mL de ácido clorídrico 0,1 M.

Ajuste o volume até 1 litro com água destilada.

Verifique o pH e ajuste para pH 7,35, se necessário.

- Solução salina tamponada de Owren

200 mL de tampão barbitúrico de Owren (vide acima).

Adicione 800 mL de solução salina normal (cloreto de sódio a 0,9%).

- Tampão imidazol (glioxalina)

Pese 2,72 g de imidazol (glioxalina) e 4,68 g de cloreto de sódio.

Coloque em um balão volumétrico e dissolva em aproximadamente 650 mL de água destilada.

Adicione 148,8 mL de HCl 0,1 M e ajuste o pH para 7,3.

Ajuste o volume até 1 litro com água destilada, se necessário.

Reagentes para testes de triagem de coagulação: nas fases iniciais de investigação e diagnóstico de distúrbios hemorrágicos, a seleção e a aplicação de reagentes adequados para testes de triagem, particularmente para os testes de tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA), são de grande importância. Muitos reagentes diferentes estão disponíveis em todo o mundo. Quando houver uma grande variedade de opções, a seleção deve levar em consideração a variação da sensibilidade. Na triagem de um distúrbio hemorrágico por TP e TTPA, as seguintes fontes de informação em relação ao provável desempenho de um determinado reagente podem ser consideradas:

- Dados comparativos em relação a outros reagentes provenientes de programas de avaliação externa de qualidade (EQA), como o programa de EQA internacional
- Dados publicados
- Testes locais de plasma de pacientes com defeitos conhecidos
- Fichas técnicas dos fabricantes

A produção local de reagentes de TP e TTPA pode ser financeiramente atrativa, mas pode causar dificuldades de padronização e, portanto, deve ser evitada. Deve-se observar também que alguns fabricantes oferecem reagentes diferentes. Além disso, a composição de reagentes com o mesmo nome pode ser alterada periodicamente. Isso significa que não é possível fornecer recomendações para o uso de uma determinada fonte de material.

Referências

Graves S, Holman B, Rossetti M, Estey C, Felder R. Robotic automation of coagulation analysis. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278: 269-279.

Kitchen S, Olson JD, Preston FE (eds). Quality in laboratory hemostasis and thrombosis 2nd ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell, 2013.

Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Technological advances in the hemostasis laboratory. *Semin Thromb Hemost* 2014; 40: 178-185.

Qari MH. High throughput coagulation analyzers review. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005; 8: 353-360.

Rodak BF (ed). Diagnostic hematology. Philadelphia: WB Saunders, 1995.

Sasaki M, Kageoka T, Ogura K, Kataoka H, Ueta T, Sugihara S. Total laboratory automation in Japan: Past, present and the future. *Clinica Chimica Acta* 1998; 278: 217-227.

Walenga JM, Fareed J. Automation and quality control in the coagulation laboratory. *Clin Lab Med* 1994; 14: 709-728.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12: 229-236.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Método de Preparação de PNP
- ✓ Como Validar Equipamentos e Testes de Coagulação
- ✓ Processos de Amostras para Validação de Equipamentos/Reagentes
- ✓ Validação ou Verificação
- ✓ Precisão e Exatidão
- ✓ Estabelecimento de Intervalo de Referência
- ✓ Validação versus Verificação do Intervalo de Referência
- ✓ Análise Estatística do Intervalo de Referência
- ✓ Controle de Qualidade Interno e Avaliação Externa de Qualidade

O pool de plasma normal (PNP) é um componente essencial para o laboratório de hemostasia, pois é utilizado em diferentes protocolos de teste, desde a avaliação de TTPA prolongado até a avaliação de inibidores específicos e inespecíficos. Também pode ser usado como material de referência para calibração e controle normal, desde que sejam observadas condições ideais para esse fim. O protocolo de como o PNP deve ser preparado é apresentado a seguir.

Tabela 4. Requisitos para preparação do PNP

Doadores	Mínimo de 20 indivíduos normais e saudáveis, que não estejam tomando medicamentos que interfiram nos fatores de coagulação e na reação de coagulação. É aceitável incluir mulheres que estejam tomando anticoncepcionais orais. Um número aproximadamente igual de homens e mulheres é desejável. A faixa etária deve ser de 20 a 50 anos.
Anticoagulante	Citrato trissódico di-hidratado 0,109 M (3,2%) tamponado com ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanossulfônico (HEPES) a 5 g por 100 mL de citrato trissódico.
Coleta	Sangue dos doadores é coletado entre 9:00 e 11:00 usando seringas descartáveis de plástico de 60 mL e agulhas borboleta de calibre 21.

Método de Preparação do PNP:

- ✓ Colete 54 mL de sangue e misture com 6 mL de anticoagulante em recipientes de plástico.
- ✓ Armazene a amostra em gelo derretido durante a preparação do pool.
- ✓ Centrifugue a 4°C por 15 minutos a 2500 g.
- ✓ Colete o plasma em um recipiente de plástico sem contato.
- ✓ Divida em alíquotas de 0,5 mL em frascos plásticos de 1,5 mL.
- ✓ Congele rapidamente em gelo seco/CO₂ sólido, se disponível. Alternativamente, coloque imediatamente em prateleira aberta a -70°C.
- ✓ Conclua o procedimento acima em até quatro horas.
- ✓ Estável a -70°C por > seis meses.

O PNP preparado dessa forma terá níveis de fator II (FII), fator V (FV), fator VII (FVII), fator IX (FIX), fator X (FX), fator XI (FXI), fator XII (FXII), cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e pré-caliceína (PKK) em torno de 1 U/mL ou 100 U/dL, embora os níveis de FVIII e fator de von Willebrand (FVW) variem amplamente em diferentes pools de PNP. O PNP local deve ser calibrado em Unidades Internacionais (UI), visto que padrões internacionais estão disponíveis para todos os fatores de coagulação acima mencionados, com exceção do FXII. O pool pode ser usado sem calibração, com potência presumida de 100 U/dL ou 1 U/mL para FXII. Para calibrar em UI, é necessário

obter preparações de referência calibradas da Organização Mundial da Saúde (OMS) (mantidas no *National Institute for Biological Standards and Control* [Instituto Nacional de Padrões e Controle Biológicos], South Mimms, Potters Bar, Herts, Reino Unido) ou adquirir plasma de referência comercial adequado que tenha sido calibrado em UI pelo fabricante. Deve-se considerar a substituição desse pool de plasma a cada 12 a 18 meses, a menos que haja evidências provenientes de resultados do controle de qualidade interno (CQI) de que a estabilidade foi mantida.

Método de calibração do PNP local:

- ✓ Obtenha um padrão calibrado, como o padrão internacional (IS) da OMS (mínimo de dois frascos).
- ✓ Em dois dias diferentes, utilize um frasco de IS e quatro alíquotas de PNP local.
- ✓ No primeiro dia, teste IS, local, local, local, local, IS e repita usando novas diluições de cada plasma.
- ✓ No segundo dia, teste local, local, IS, IS, local, local, local e repita usando novas diluições de cada plasma.

Calcule a potência de cada alíquota do padrão local em relação à média dos resultados com os dois IS.

- ✓ O resultado médio de 4 alíquotas x 2 diluições x 2 dias ($n = 16$) é atribuído ao padrão local como sua potência.

Como Validar Equipamentos e Testes de Coagulação: antes de utilizar um novo método, é essencial que ele seja avaliado quanto à sua adequação para a finalidade pretendida. Este capítulo apresenta uma recomendação geral sobre como planejar e executar os processos necessários para seleção e avaliação de analisadores/sistemas de teste de hemostasia. Essas recomendações não pretendem substituir regulamentações ou normas, mas sim fornecer orientação sobre as etapas necessárias para atender às boas práticas de laboratório.

A extensão da avaliação de um sistema de teste dependerá de vários fatores, incluindo: (a) o uso pretendido do sistema de teste; b) se o sistema de teste foi considerado aprovado para uso clínico por órgãos ou estatutos regionais; c) os recursos disponíveis do laboratório. Ao escolher um sistema de teste, deve-se realizar uma pesquisa para determinar quais analisadores de hemostasia estão disponíveis. Uma lista de requisitos deve ser elaborada para identificar o melhor sistema para o seu laboratório, detalhando as características físicas do laboratório, bem como o desempenho exigido do equipamento. O planejamento da validação é uma etapa importante e está relacionado aos resultados obtidos, visto que o bom planejamento pode gerar uma validação tecnicamente adequada. Para tanto, é importante estimar um prazo realista para a avaliação, com base nos recursos disponíveis e no escopo da avaliação. É necessário definir os detalhes do processo de avaliação (em etapas), que deve ser revisado e aprovado pelo responsável do setor. O plano de validação deve detalhar o parâmetro de avaliação (por exemplo, imprecisão), os testes a serem realizados e o resultado desejado (por exemplo, limites estatísticos). Como alguns sistemas de teste podem exigir amostras incomuns ou que abranjam uma ampla faixa de valores, pode ser aconselhável iniciar a coleta e o congelamento das amostras com semanas ou até meses de antecedência. As quantidades de consumíveis (incluindo reagentes) necessários para a avaliação do sistema de teste devem ser estimadas, com espaço para planos de contingência caso seja necessário trabalho adicional. O laboratório deve documentar cada etapa do processo de avaliação, incluindo manutenção preventiva dos instrumentos, avaliações de temperatura e dados gerados nas etapas de validação ou verificação. O gerente do laboratório deve analisar os dados e registrar o resultado da análise. É aconselhável ter uma pasta de registro digital dedicada e rotulada para a validação e avaliação do sistema. Independentemente disso, qualquer forma de avaliação do sistema de teste deve estar prontamente disponível para uma eventual necessidade de verificar a adequação do laboratório.

Processos de Amostras para Validação de Equipamentos/Reagentes: o processamento de amostras utilizado no processo de validação deve ser o mesmo das amostras de teste de pacientes. Para o teste de TP, estudos mostram que a estabilidade do plasma processado é de 24 horas quando mantido em temperatura ambiente, mas, quanto mais rápido for o processamento, melhor será a garantia de qualidade. Amostras de plasma para outros testes devem ser testadas em até 4 horas após a coleta. Se as amostras não puderem ser testadas dentro dos limites de estabilidade aceitáveis, amostras de plasma pobre em plaquetas (PPP) devem ser produzidas, alíquotadas e armazenadas congeladas a -70°C .

(Favaloro et al, 2008). Antes da análise, as amostras congeladas devem ser descongeladas a 37°C (3 a 5 minutos para alíquotas de até 1 mL) e misturadas imediatamente antes do teste (Kitchen et al, 2021).

Validação ou Verificação: em geral, a validação é um processo que deve ser realizado em sistemas de teste totalmente novos ou em um teste desenvolvido no laboratório. A verificação, por outro lado, é um processo que pode ser aplicado a sistemas de teste já validados que foram recentemente introduzidos no mercado de diagnóstico. A verificação também pode ser aplicada à avaliação após o equipamento ter sido realocado. Se um sistema de teste tiver sido aprovado pela autoridade regulatória regional, apenas o processo de verificação do sistema de teste pode ser realizado localmente. Nesse caso, a verificação pode ser definida como o fornecimento de evidências objetivas de que um determinado sistema de teste atende localmente às especificações definidas pelo fabricante. O desvio das instruções de uso do fabricante para um sistema de teste exigirá acompanhamento para validação do sistema (Castellone, 2017).

Precisão e Exatidão: após a instalação do equipamento, é importante avaliar o grau de imprecisão intra-execução dos testes a serem avaliados. Essa prática é útil para identificar valores discrepantes e variabilidade no sistema de medição. O número de testes necessários para avaliação dependerá se os sistemas de teste requerem validação ou verificação (Gardiner et al., 2021a). Para estudos de exatidão, as amostras testadas dependerão do tipo de amostras de pacientes que deverão ser testadas no laboratório. A exatidão é uma avaliação importante, definida como a concordância entre uma medição e o valor real. A exatidão geralmente é avaliada comparando novos instrumentos ou sistemas de reagentes com um método existente ou predeterminado (Eusebi, 2013). A comparação entre sistemas deve ser realizada por meio de análise estatística. A comparabilidade entre sistemas pode ser analisada por meio de regressão linear (normal, ponderada, Deming ou Passing-Bablok, conforme o caso), gráficos de tendência de Bland-Altman e testes t pareados (ou testes U de Mann-Whitney, se os dados não forem normalmente distribuídos) (Jensen and Kjølgaard-Hansen, 2006). Os critérios de aceitabilidade serão específicos para o teste. Para o teste de TTPA, por exemplo, dois sistemas de teste diferentes que utilizam reagentes diferentes podem gerar resultados com diferenças clinicamente significativas (Montalvão et al, 2020). Avaliações de sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo e positivo do teste também são informações relevantes e fundamentais para alguns testes. Ensaio calibrado que não possuem um padrão internacional (por exemplo, FVIII) e metodologia padronizada devem produzir uma linha de regressão com inclinação próxima a 0,90-1,10, com forte correlação ($r > 0,95$) e sem viés clinicamente significativo (Gardiner et al, 2021b). O número exato de amostras para a avaliação estatística do processo de verificação/validação dependerá dos critérios de aceitabilidade de cada teste. A participação em um programa de EQA pode ser útil para estabelecer a exatidão do sistema antes de implementá-lo na rotina de pacientes (Montalvão et al, 2022).

Estabelecimento de Intervalo de Referência: estabelecer um intervalo de referência normal é uma das tarefas mais importantes realizadas no laboratório, pois a maioria das decisões médicas são tomadas com base em resultados laboratoriais. Os testes de coagulação apresentam um conjunto único de desafios. Os reagentes usados em testes de rotina podem ter diferentes sensibilidades à coagulação com base na concentração e no tipo de fosfolípido e ativadores. Um exemplo clássico disso são os reagentes usados no teste de TTPA, que usam partículas (por exemplo, caulim, celite, sílica) ou produtos químicos (por exemplo, ácido elágico) que afetam diretamente a sensibilidade e a especificidade do teste. Nesse contexto, as diferentes partículas, bem como a classe de fosfolípidios e a composição de ácidos graxos, não são padronizadas. Portanto, reagentes de diferentes fornecedores podem ter composições diferentes. Todas essas propriedades dos reagentes precisam ser consideradas ao estabelecer um intervalo de referência normal. Portanto, é essencial que o laboratório realize a determinação local da faixa de referência normal para que o conjunto de reagentes, equipamentos e procedimentos possa ser levado em consideração ao avaliar o paciente. Saúde não é uma condição bem definida e, muitas vezes, é um termo relativo. O grupo ideal em alguns casos pode corresponder estreitamente à população sob investigação em termos de idade e sexo. No entanto, essa seleção cuidadosa não é essencial para muitos testes de coagulação. Na prática, a seleção de indivíduos normais e sadios para o estabelecimento de uma faixa normal será influenciada por considerações práticas. Funcionários sadios de hospitais que não recebem nenhum medicamento e doadores de sangue sadios podem ser utilizados com sucesso. Há considerações importantes em relação às faixas normais, que são apresentadas a seguir. A condição dos indivíduos normais no momento da coleta de sangue pode influenciar os resultados obtidos. Isso inclui uma revisão das evidências sobre os efeitos do estresse físico (por exemplo, persistência de até 10 horas de um aumento de 2,5

vezes no FVIII/FVW), estresse mental (por exemplo, aumento no FVIII e no FVW após estresse mental agudo), efeitos hormonais, variações circadianas e os efeitos da postura e da dieta. Foram feitas algumas recomendações gerais que não se restringiram à investigação de pacientes do sexo feminino. Estas foram as seguintes:

- ✓ Não realizar exercícios físicos intensos nas 24 horas anteriores à punção venosa.
- ✓ Utilizar um ambiente onde o estresse físico e mental seja reduzido.
- ✓ Não ingerir alimentos gordurosos nem fumar na manhã da punção venosa.
- ✓ Coletar amostras no início da manhã (das 7:00 às 9:00), após o indivíduo permanecer sentado em posição relaxada por 20 a 30 minutos.

Validação versus Verificação do Intervalo de Referência: os resultados do intervalo de referência são avaliados estatisticamente e o tipo de avaliação estatística se baseia no número de indivíduos utilizados. O processo pode incluir validação ou verificação completa, quando o intervalo de referência é previamente estabelecido. A validação requer um estudo com no mínimo 120 indivíduos, enquanto a verificação de uma faixa de referência requer apenas 20 indivíduos para demonstrar que um teste funciona conforme já estabelecido. O intervalo de referência deve ser verificado com qualquer alteração de reagente, número de lote e instrumento ou sistema de coleta. A média e o desvio padrão (DP) podem ser calculados (Gardiner et al, 2021a).

Análise Estatística do Intervalo de Referência: o DP é a dispersão dos dados em torno da média. Quanto mais dispersos os dados, maior o desvio. O intervalo de confiança mede o nível de incerteza. Se o nível de confiança de 95% for escolhido, os intervalos serão estimados nos percentis 2,5 e 97,5 da distribuição dos resultados. Isso garante que o intervalo de confiança dos valores contenha a média real de 95% da população. Níveis de confiança mais altos terão intervalos de referência mais amplos, enquanto intervalos de confiança mais baixos serão mais estreitos (Henny et al, 2016).

Diferentes métodos estatísticos podem ser utilizados para avaliar dados:

- (1) Método paramétrico: é utilizado quando a distribuição populacional é normal ou gaussiana.
- (2) Método não paramétrico: não requer leis de probabilidade devido a seleção cuidadosa dos sujeitos e um número suficiente de indivíduos testados (≥ 120).
- (3) Método robusto: para uso em um número limitado de indivíduos sem exigir que a distribuição seja gaussiana e mede a posição (localização) e a dispersão (espalhamento) em vez da média e do desvio padrão.

Medidores de posição organizam os dados do menor para o maior em partes iguais, enquanto as análises de dispersão avaliam a distância entre os valores da distribuição e o centro. Para verificar a existência de valores discrepantes, os dados podem ser inspecionados visualmente e avaliados por meio de um método proposto por Dixon (Henny et al, 2016). Com um tamanho de amostra de 20 (verificação do intervalo de referência), dois valores discrepantes são permitidos. Se houver mais de dois valores discrepantes, 20 amostras adicionais devem ser testadas. Se houver outros dois valores discrepantes, outras fontes de erro, como reagentes, problemas no analisador ou variação biológica, devem ser investigadas (Henny et al, 2016). Pode ser necessário realizar um análise completa do intervalo de referência.

Controle de Qualidade Interno e Avaliação Externa de Qualidade: garantia de qualidade (GQ) é um termo geral que pode ser usado para descrever todas as medidas adotadas para garantir a confiabilidade de testes e laudos laboratoriais. Isso inclui a escolha do teste, a coleta de uma amostra válida do paciente, a análise da amostra e o registro dos resultados de forma oportuna e exata até a interpretação dos resultados, quando apropriado, e a comunicação desses resultados aos médicos solicitantes. CQI e avaliação externa de qualidade (EQA) (às vezes chamada de teste de proficiência) são dois componentes distintos, porém complementares, de um programa de garantia de qualidade laboratorial. O CQI é usado para estabelecer se uma série de técnicas e procedimentos têm desempenho consistente ao longo de um período. Portanto, é implantado para garantir a consistência diária do laboratório. A EQA é usada para identificar o grau de concordância entre os resultados de um laboratório e aqueles obtidos por outros centros.

Controle de qualidade interno: o CQI é usado para estabelecer se uma série de técnicas e procedimentos têm desempenho consistente ao longo do tempo. O termo “controle de qualidade” é comumente usado para descrever o conjunto de procedimentos utilizados para verificar se os resultados de exames laboratoriais são confiáveis o suficiente para serem divulgados e auxiliar na tomada de decisões clínicas, no monitoramento da terapia e no diagnóstico de anormalidades hemostáticas. Procedimentos de controle de qualidade devem ser aplicados de forma a garantir o controle imediato e constante da geração de resultados.

Em um ambiente laboratorial, a qualidade dos resultados obtidos é influenciada por diversos fatores, incluindo:

- Coleta e manuseio adequados das amostras
- Seleção de técnicas adequadas e manutenção de um manual atualizado de procedimentos operacionais padrão
- Uso de reagentes e materiais de referência confiáveis
- Seleção de automação apropriada e manutenção adequada
- Registros adequados
- Sistema de relato de resultados

Além disso, a qualidade dos resultados obtidos na prática de rotina depende muito da seleção, do treinamento e da motivação de um complemento apropriado de pessoal adequado.

O CQI é particularmente útil para identificar o grau de precisão de uma técnica específica — precisão sendo o grau de concordância entre medições repetidas em uma amostra. Para garantir que os resultados obtidos no laboratório sejam confiáveis, eles devem ser precisos em suas análises. O CQI garante a consistência diária de um processo analítico e, portanto, ajuda a determinar se os resultados dos pacientes são confiáveis o suficiente para serem divulgados. Um programa de CQI deve consultar instituições que embasam as diretrizes de qualidade laboratorial, como a *International Organisation for Standardisation (ISO)* [Organização Internacional de Normalização] ou o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* [Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais]. Os testes laboratoriais devem ser capazes de identificar resultados fisiológicos e patológicos, independentemente de quando o teste for realizado. Nas recomendações da ISO 15189:2022, o laboratório deve ter um procedimento de CQI para monitorar a validade contínua dos resultados dos exames, de acordo com critérios definidos, que verifique a obtenção da qualidade pretendida e garanta validade consistente em relação à tomada de decisão clínica. O CQI deve ser realizado com frequência baseada na estabilidade e robustez do método de exame e no risco de danos ao paciente decorrentes de um resultado errôneo. Na CLSI H47-A2 Vol. 28 N° 207.8, para todos os sistemas de teste de coagulação não manuais, no mínimo, o laboratório deve incluir pelo menos dois níveis de material de controle a cada 8 horas de operação e cada vez que um reagente for trocado.

Materiais de controle de qualidade interno: para avaliar a precisão de um método específico, é necessário realizar análises repetidas de alíquotas da mesma amostra. É importante incluir amostras de controle de qualidade (CQ) com valores normais e anormais para garantir que o método esteja sob controle em diferentes níveis de um determinado analito, visto que alterações relativamente pequenas em um processo analítico podem ser mais aparentes ao testar um controle anormal. O material de controle deve ter propriedades semelhantes às amostras de teste e ser analisado simultaneamente. Materiais de controle de qualidade de origem humana têm maior probabilidade de se assemelhar a amostras de teste humanas. Todos os frascos ou alíquotas do material de controle devem ser praticamente idênticos para que qualquer variação nos resultados do teste não seja consequência da variação entre frascos. O material de CQ também deve permanecer estável durante o período de uso pretendido. Em relação aos testes e ensaios hemostáticos, as amostras de plasma devem ser congeladas (preferivelmente a -35°C ou menos) ou liofilizadas para garantir estabilidade adequada para uso como material de CQ. Para reconstituição de amostras liofilizadas, é importante usar água destilada com pH 6,8–7,2 e aguardar pelo menos cinco minutos para a reconstituição. Se for usado material de CQ comercial, este deve ser reconstituído de acordo com as instruções do fabricante por meio de um sistema de pipetagem exato. Se for usado material de CQ congelado, este deve ser descongelado rapidamente a 37°C por cinco minutos. Na seleção do material de CQ, o risco de transmissão de vírus transmitidos pelo sangue deve ser considerado. Material de alto risco não deve ser usado. Pelo menos um material de CQ deve ser incluído em cada grupo de testes ou ensaios de triagem. Para testes de triagem, pode ser mais apropriado incluir um CQ normal dessa forma e testar materiais de CQ anormais uma vez por dia ou turno, ou quando houver dúvida sobre se um método está sob controle. Um material de CQ com nível reduzido deve ser incluído nos testes usados para

diagnóstico e monitoramento de estados de deficiência congênita associados a sangramento. Em todos os casos, o material de controle deve ser tratado exatamente como as amostras de teste, se possível.

Limites de variação aceitáveis: para CQI comercial, os fabricantes de amostras geralmente fornecem uma faixa alvo de valores aceitáveis. No caso de testes e ocasionais ensaios de triagem, os resultados obtidos dependerão dos reagentes e do sistema de detecção de ponto final usados para realizar os testes. A faixa alvo deve levar esses efeitos em consideração. Quando não houver faixa alvo disponível para uma técnica específica, isso pode ser estabelecido localmente. O material de CQI é testado repetidamente (no mínimo 10 vezes) em dias diferentes quando se sabe que o método está sob controle (conforme indicado, por exemplo, por resultados dentro do alvo em um material de CQ alternativo). A média e o DP desses resultados são então calculados. O DP é a raiz quadrada da soma de d^2 dividida por $n-1$, onde d é a diferença dos resultados individuais em relação à média e n é o número de determinações. O DP é uma medida da dispersão dos resultados; quanto maior o DP, maior a dispersão dos resultados. Outro parâmetro importante é o coeficiente de variação (CV), que é o DP expresso como porcentagem da média ($CV = DP \text{ dividido pela média, multiplicado por } 100\%$). O CV dos resultados em dias diferentes para TP e TTPA de uma amostra de CQ deve ser sempre menor que 8%, e de preferência mais baixo. Para ensaios como FVIII:C e FIX, CVs menores que 10% devem ser atingíveis para testes realizados ao longo de vários dias. Na maioria dos casos, os resultados obtidos com uma amostra de CQI apresentarão distribuição normal (gaussiana). É prática comum definir a faixa alvo para os resultados de CQI como a média ± 2 DP, visto que esta deve incluir 95% dos valores. Os resultados individuais devem ser registrados em uma tabela que identifique a faixa alvo. Resultados fora dessa faixa indicam que o material de CQ se deteriorou ou foi manuseado incorretamente, ou que o método não está devidamente controlado. A repetição de testes com mais material de CQ diferenciará essas duas possibilidades, com novos resultados fora dos limites confirmando que o sistema de teste está fora de controle.

Avaliação externa de qualidade: em grandes programas de EQA, a análise retrospectiva dos resultados obtidos pelos laboratórios participantes permite a identificação não apenas do baixo desempenho individual de cada laboratório, mas também de reagentes e métodos que produzem resultados não confiáveis ou enganosos. A principal função da EQA é a realização de testes de proficiência de testes laboratoriais individuais. O Programa de Avaliação Externa de Qualidade Internacional (IEQAS) da Federação Mundial de Hemofilia (WFH) inclui análises de particular relevância para o diagnóstico e o manejo de distúrbios hemorrágicos (para mais informações, entre em contato com a WFH). Dados deste programa foram publicados nas seguintes referências:

- Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Development of a World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme: results of a pilot study. *Haemophilia* 1996; 2: 4–46.
- Jennings I, Kitchen S, Woods TAL, Preston FE. Laboratory performance of haemophilia centres in developing countries: 3 years' experience of the World Federation of Hemophilia External Quality Assessment Scheme. *Haemophilia* 1998; 4: 739-746.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID, Preston FE. Laboratory performance in the WFH EQA programme 2003-2008. *Haemophilia*. 2009; 15:571-7.
- Silmara Montalvão, Ian Jennings, Christopher Reilly-Stitt, Dianne Kitchen, Steve Kitchen. Quality of diagnosis and lab monitoring of people with hemophilia and other bleeding disorders across the continents: WFH IEQAS programme 2016-2023.

O IEQAS da WFH foi lançado em 2004 para monitorar e aprimorar o desempenho laboratorial em centros de tratamento de hemofilia (HTCs) no mundo todo. Os laboratórios podem participar desse programa para avaliar seus sistemas de garantia de qualidade e a confiabilidade dos resultados de seus testes. O IEQAS aprimora e padroniza o diagnóstico laboratorial por meio da auditoria da eficácia dos sistemas internos de garantia de qualidade em vigor e da medição da competência do laboratório. O Programa de Avaliação Externa de Qualidade Nacional do Reino Unido (NEQAS RU) opera o programa de Coagulação Sanguínea, com sede em Sheffield, que foi inspecionado pelo United Kingdom Accreditation Service Ltd (UKAS) e recebeu acreditação total na ISO 17043 para todos os testes listados. A obrigação do IEQAS da WFH é proporcionar uma EQA para testes de coagulação sanguínea e promover altos padrões de desempenho e prática. A EQA, juntamente com os procedimentos de CQI, são componentes fundamentais da garantia de qualidade laboratorial global. Além disso, o IEQAS da WFH oferece um serviço de consultoria aos participantes por meio de intercâmbios sobre diagnóstico laboratorial, incluindo uma reunião de participantes durante

o Congresso Mundial da WFH, que acontece a cada dois anos, e visitas presenciais/virtuais para treinamento, conforme necessário. O Comitê do IEQAS da WFH é responsável por supervisionar o programa IEQAS. O comitê é formado por um presidente independente indicado pela WFH, pelo diretor do programa, pela equipe do programa IEQAS nos Hospitais Universitários de Sheffield (instituição anfitriã) e equipe e voluntários da WFH. O Comitê do IEQAS supervisiona todos os aspectos operacionais do programa, avalia a participação no programa, analisa os resultados, monitora o desempenho global dos laboratórios e fornece suporte consultivo aos centros registrados no programa. As pesquisas do IEQAS da WFH são distribuídas três vezes por ano, normalmente em março, julho e novembro. Todas as pesquisas geralmente incluem TP, TTPA, ensaio de FVIII e ensaio de FIX. Duas das três pesquisas incluem o ensaio de antígeno FVW e o ensaio de atividade do cofator de ristocetina/FVW. Uma das três pesquisas inclui dois outros ensaios de fatores, de modo que os ensaios de FII, FV, FVII, FX e FXI são avaliados em algum momento, juntamente com o fibrinogênio. Para mais detalhes, entre em contato pelo e-mail neqas@coageqa.org.uk.

Referências

- Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 121–127.
- Eusebi P. Diagnostic accuracy measures. *Cerebrovasc Dis*. 2013; 36(4): 267–272.
- Favaloro EJ, Lippi G, Adcock DM. Preanalytical and postanalytical variables: the leading causes of diagnostic error in hemostasis? *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(7): 612–634.
- Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *Int J Lab Hematol* 2021a; 43(2): 169–183.
- Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the verification of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 2: Specialist tests and calibrated assays. *Int J Lab Hematol* 2021b; 43(5): 907–916.
- Henny J, Vassault A, Boursier G, Vukasovic I, Mesko Brguljan P, Lohmander M et al. Recommendation for the review of biological reference intervals in medical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 2016; 54(12): 1893–1900.
- Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Vet Clin Pathol* 2006; 35(3): 276–286.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272–1283.
- Montalvão SAL, Francisco AP, da Silva BLQ, Huber SC, Aguiari HJ, Fernandes MCGL et al. From hemophilia to deep venous thrombosis patient samples: How to perform an easy coagulometer validation process according to available guidelines. *Clin Appl Thromb Hemost* 2020; 26: 1076029620915512.
- Montalvão SAL, Lowe A, Kitchen S. Advantages of external quality assessment-EQA programs. *Haemophilia* 2022; 28(4): 679–686.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Coleta de Sangue
- ✓ Plasma Pobre em Plaquetas (PPP)
- ✓ Substâncias Interferentes
- ✓ Armazenamento
- ✓ Descongelamento

Antes da coleta de sangue, alguns fatores devem ser considerados. Não é necessário jejum antes da coleta de sangue para a maioria dos exames de sangramento e trombose. No entanto, uma exceção é o teste de homocisteína, que requer jejum. Exercícios físicos (Venema et al, 2017) e estresse (Austin et al, 2012) podem causar aumentos temporários de FVIII e FVW. Exercícios também podem afetar o teste de dímero D (Huskens D et al, 2016). A inflamação pode afetar os fatores de coagulação e outros parâmetros hemostáticos (Hardy et al, 2024). A gravidez afeta uma variedade de parâmetros, incluindo FVIII (Castaman, 2013), FVW (Delbrück et al, 2019) e dímero D (Blombäck et al, 2007). Vários produtos farmacêuticos e anticoagulantes podem interferir nos testes de hemostasia, portanto, informações sobre os tratamentos dos pacientes são essenciais para o laboratório (Gosselin et al, 2019).

Coleta de Sangue: diversas diretrizes que descrevem as melhores práticas para coleta e processamento de amostras para testes hemostáticos estão disponíveis (CLSI, 2024; CLSI, 2017). A coleta de sangue deve utilizar um sistema de coleta a vácuo ou seringa plástica com agulha de calibre 19 a 21 (adultos) ou de calibre 22 a 23 (crianças) (Srivastava et al, 2021). Os tipos de tubo não são todos iguais, portanto, os centros devem usar um único tipo de tubo e gerar intervalos de referência com base nesses tubos (Bowen et al, 2016). Mesmo em um tipo de tubo de coleta, a constituição é importante; tubos de plástico e vidro não são intercambiáveis (Fiebig et al, 2005). Os tubos de coleta de sangue devem conter 0,105 a 0,109 M (3,2%) de citrato trissódico (CLSI, 2024). A sequência de coleta é importante para evitar contaminação cruzada por EDTA (Lima-Oliveira et al, 2015) ou heparina (Keppel et al, 2019); portanto, as melhores práticas na coleta de amostras devem ser seguidas (OMS, 2010; Simundic et al, 2018). As amostras requerem anticoagulação imediata após a punção venosa, com enchimento mínimo de 80% do volume alvo (Kitchen et al, 2021) para atingir a proporção sangue:anticoagulante de 9:1. A inversão suave (3 a 5 vezes) dos tubos de sangue após flebotomia permite a mistura adequada das amostras. Alterações hemostáticas indesejadas ocorrem em tubos subpreenchidos (Lippi et al, 2012). Amostras com níveis de hematócrito >55% requerem solução de citrato ajustada para compensar o alto volume globular e obter a proporção correta de 9:1. Alterações significativas no TP, TTPA e monitoramento de anticoagulantes (RNI) podem ser observadas se essa proporção não for mantida (Marlar et al, 2006). A fórmula recomendada para reajustar os níveis de citrato é apresentada abaixo (Kitchen et al, 2021). As amostras devem ser devidamente rotuladas imediatamente antes ou depois da flebotomia, de acordo com as políticas regulatórias ou institucionais locais.

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

C = volume de citrato em mililitros (mL) que deve ser adicionado a um volume de sangue (V)

HCT = hematócrito do paciente

V = volume de sangue adicionado em mL

E $1,85 \times 10^{-3}$ é constante

Um exemplo utilizando HCT de 70% e 4,5 mL de sangue coletado antes da adição do anticoagulante resulta no seguinte cálculo, ou seja, 0,25 mL de citrato são misturados com 4,5 mL de sangue.

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

$$(1,85 \times 0,001)(100 - 70)(4,5 \text{ mL}) = 0,25 \text{ mL de citrato}$$

Plasma Pobre em Plaquetas (PPP): a maioria dos testes de coagulação pode ser realizada com PPP após centrifugação a >1700 g por 10 minutos (CLSI, 2024; Kitchen et al, 2021). Centrifugas refrigeradas devem ser evitadas, visto que a ativação a frio do fator plaquetário 4 pode afetar o monitoramento da heparina, os testes de função plaquetária, os testes de FVIII e os testes de FVII (Favaloro, 2004). Alguns testes, como de heparina não fracionada (HNF) e anticoagulante lúpico, requerem plasma livre de plaquetas centrifugado duas vezes (<10 x 10⁹) se o teste for realizado em amostras previamente congeladas. Nesse caso, o plasma é removido do tubo de sangue centrifugado para um recipiente secundário adequado e centrifugado novamente com subalíquotas removidas para congelamento. O teste de função plaquetária requer plasma rico em plaquetas (PRP), preparado após centrifugação a 170 g por 15 minutos ou 250 g por 10 minutos (Gomes et al, 2021).

Substâncias Interferentes: amostras hemolisadas não devem ser testadas, pois podem ser observadas alterações significativas, particularmente no TTPA (Woolley et al, 2016; Lippi et al, 2013), exceto quando a hemólise for intravascular (Arachchillage et al, 2014). Ensaios de rotina geralmente não são afetados por icterícia (Woolley et al, 2016) e a lipemia pode ser eliminada por ultracentrifugação (Lippi et al, 2013, Dimeski e Jones, 2011).

Armazenamento: o teste de amostras é sensível ao tempo. O processamento e o teste das amostras devem ser realizados dentro da janela de estabilidade do ensaio após a punção venosa, e as amostras devem ser armazenadas em temperatura ambiente durante esse período. As diretrizes recomendam o teste em até 4 horas (CLSI, 2024) para todas as amostras, a menos que dados locais confirmem estabilidade prolongada para uma combinação específica de tubo/ensaio (Kitchen et al, 2021; Linskens et al, 2018). O armazenamento em temperaturas mais altas pode levar à perda de fatores de coagulação, como o FVIII (Omidkhoda et al, 2011). A liberação de fator plaquetário 4 pode causar neutralização da heparina não fracionada nas amostras, por isso esses tubos devem ser centrifugados em até 1 hora e analisados em até 4 horas (Baker et al, 2020). Se o plasma for armazenado para testes posteriores, as condições de armazenamento podem afetar alguns ensaios. O plasma pode ser armazenado de forma aceitável a -24°C por 3 meses. Contudo, no armazenamento de longo prazo (aproximadamente 6 meses), as amostras devem ser armazenadas a -70°C (Woodhams et al, 2001; Fenclova et al, 2023).

Descongelamento: amostras congeladas para teste devem ser descongeladas em banho-maria a 37°C por 3 a 5 minutos e invertidas várias vezes antes do teste para homogeneizar a amostra (Jo et al, 2020). Deve-se evitar o recongelamento do plasma descongelado para testes posteriores.

Referências

- Arachchillage DJ, Platton S, Hickey K, Chu J, Pickering M, Sommerville P, MacCallum P, Breen K. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Br J Haematol* 2024; 205(3): 855-880.
- Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Känel R. Stress-induced alterations in coagulation: Assessment of a new hemoconcentration correction technique. *Psychosom Med* 2012; 74(3): 288-295.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Blombäck M, Konkle BA, Manco-Johnson MJ, Bremme K, Hellgren M, Kaaja R. Preanalytical conditions that affect coagulation testing, including hormonal status and therapy. *J Thromb Haemost* 2007; 5(4): 855-858.
- Bowen RA, Adcock DM. Blood collection tubes as medical devices: The potential to affect assays and proposed verification and validation processes for the clinical laboratory. *Clin Biochem* 2016; 49(18): 1321-1330.
- Castaman G. Changes of von Willebrand factor during pregnancy in women with and without von Willebrand disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013; 5(1): e2013052.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays, 6th edition. CLSI standard H21. 2024. https://clsi.org/media/bp2jr13r/h21ed6e_sample.pdf.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection of diagnostic venous blood specimens, 7th edition. CLSI standard GP41. 2017. https://clsi.org/media/1372/gp41ed7_sample.pdf.

Delbrück C, Miesbach W. The course of von Willebrand factor and factor viii activity in patients with von Willebrand disease during pregnancy. *Acta Haematol* 2019; 142(2): 71-78.

Dimeski G, Jones BW. Lipaemic samples: Effective process for lipid reduction using high speed centrifugation compared with ultracentrifugation. *Biochem Med (Zagreb)* 2011; 21(1): 86-92.

Favaloro EJ, Soltani S, McDonald J. Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(5): 686-692.

Fenclova T, Marecek F, Hrachovinova I. Effects of frozen storage conditions and freezing rate on the stability of coagulation proteins in human plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2023; 34(6): 377-384.

Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL. Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. *Am J Clin Pathol* 2005; 124(6): 902-909.

Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.

Gosselin RC, Marlar RA. Preanalytical variables in coagulation testing: Setting the stage for accurate results. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(5): 433-448.

Hardy M, Catry E, Pouplard M, Lecompte T, Mullier F. Is lupus anticoagulant testing with dilute Russell's viper venom clotting times reliable in the presence of inflammation? *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(6): 102536.

Huskens D, Roest M, Remijn JA, Konings J, Kremers RM, Bloemen S, Schurgers E, Selmezi A, Kelchtermans H, van Meel R, Meex SJ, Kleinegris MC, de Groot PG, Urbanus RT, Ninivaggi M, de Laat B. Strenuous exercise induces a hyper-reactive rebalanced haemostatic state that is more pronounced in men. *Thromb Haemost* 2016 Jun 2;115(6):1109-19.

Keppel MH, Auer S, Lippi G, von Meyer A, Cornes M, Felder TK, Oberkofler H, Mrazek C, Haschke-Becher E, Cadamuro J. Heparin and citrate additive carryover during blood collection. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1888-1896.

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICHS) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICHS) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

Lima-Oliveira G, Salvagno GL, Danese E, Favaloro EJ, Guidi GC, Lippi G. Sodium citrate blood contamination by K2-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA): Impact on routine coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2015; 37(3): 403-409.

Linskens EA, Devreese KMJ. Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(3): 292-303.

Lippi G, Plebani M, Favaloro EJ. Interference in coagulation testing: Focus on spurious hemolysis, icterus, and lipemia. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(3): 258-266.

Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ. Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 2012; 38(6): 565-575.

Marlar RA, Potts RM, Marlar AA. Effect on routine and special coagulation testing values of citrate anticoagulant adjustment in patients with high hematocrit values. *Am J Clin Pathol* 2006; 126(3): 400-405.

Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karimi K, Froushani AR, Pourfathollah AA. A comparative study of the effects of temperature, time and factor VIII assay type on factor VIII activity in cryoprecipitate in Iran. *Blood Transfus* 2011; 9(4): 394-399.

Simundic AM, Bölenius K, Cadamuro J, Church S, Cornes MP, van Dongen-Lases EC et al. Joint EFLM-COLABIOCLI recommendation for venous blood sampling. *Clin Chem Lab Med* 2018; 56(12): 2015-2038.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Venema CL, Schutgens REG, Fischer K. Pathophysiological mechanisms of endogenous FVIII release following strenuous exercise in non-severe haemophilia: A review. *Thromb Haemost* 2017; 117(12): 2237-2242.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Woolley A, Golmard JL, Kitchen S. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 375-388.

World Health Organisation. WHO guidelines on drawing blood: Best practices in phlebotomy. 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK138650/>.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Quando Usar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ Como Executar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ TP pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ TTPA pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ Tempo de Trombina e Fibrinogênio pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ Teste de Fibrinogênio Derivado de TP
-

Existem vantagens em usar coagulômetros para testes de coagulação, incluindo velocidade de análise/produzitividade e consistência da análise, que proporcionam resultados precisos e exatos em tempo hábil. Embora muitos instrumentos diferentes para testes de coagulação estejam disponíveis e em uso em todo o mundo, a técnica de inclinação manual do tubo ainda pode ser empregada com sucesso para determinação do tempo de coagulação. Isso pode ser feito para todas as amostras, caso não haja um método automatizado adequado disponível, ou para um subgrupo de amostras, seja porque a análise automatizada não gera resultados em amostras com características específicas, causando incompatibilidade da amostra com o instrumento em uso, ou porque o método do coagulômetro está temporariamente indisponível. Métodos de inclinação do tubo são adequados como alternativas aos métodos baseados em coágulos, e mesmo laboratórios de centros de hemofilia abrangentes devem ter o método de inclinação manual do tubo disponível para as poucas amostras em que a análise automatizada não funcionar, mas cujos resultados forem realmente necessários para o manejo seguro do paciente. Isso pode ocorrer na presença de concentrações plasmáticas de lipídios muito elevadas ou quando o padrão de formação de coágulos na amostra difere acentuadamente das amostras normais, particularmente quando a polimerização de fibrinogênio em fibrina é acentuadamente anormal. Em razão das muitas variáveis e possíveis fontes de contaminação associadas às técnicas manuais, estas podem exigir testes duplicados. Se o CV entre dias dos resultados do CQI for >5%, deve-se considerar a realização de testes duplicados. Quando os testes forem realizados em duplicata, os dois resultados devem estar dentro de +/- 5% da média com a prática.

Quando Usar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo: o método de inclinação manual do tubo pode ser usado com sucesso para determinação de TP, TTPA, tempo de trombina e fibrinogênio, bem como em ensaios de fatores de coagulação baseados em TP e TTPA.

Como Executar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo: o método de execução da técnica de inclinação do tubo para testes de coagulação foi recentemente harmonizado em relação ao teste de TP como parte da calibração de tromboplastinas de referência para o sistema de razão normalizada internacional (RNI) usado para monitorar medicamentos antagonistas da vitamina K (Van den Besselaar et al, 2020). Esse método harmonizado melhorou a concordância entre os resultados de TP com inclinação do tubo quando o teste é realizado por diferentes operadores e em diferentes centros. Esse método pode ser usado para testes com inclinação do tubo para análise de TTPA, tempo de trombina e fibrinogênio, além do teste de TP.

Materiais necessários:

- 1) Banho-maria para manter os tubos de ensaio em temperatura constante de 37°C. Dimensões próximas a 40 x 30 x 20 cm são convenientes. A água no banho deve ser circulada continuamente por uma bomba, se possível. A temperatura deve ser de 37°C (limites de tolerância: 37 ± 0,5°C). A temperatura deve ser controlada com um termômetro calibrado.
- 2) Fonte de luz, como uma luminária articulada, colocada 20 cm acima do nível da água, pode ser usada para iluminar o tubo de ensaio durante a inclinação, o que facilita a detecção do coágulo no ponto final

pelo operador. O uso de LED como fonte de luz é preferível às lâmpadas que geram calor, pois podem elevar a temperatura dos tubos de ensaio mantidos próximos à fonte de luz.

- 3) Os tubos de ensaio devem ser tubos de vidro não siliconizados sem uso. Tubos de cultura descartáveis (código de catálogo 73500-1275, Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, Nova Jersey) com dimensões de 75 x 12 mm e espessura de parede de 0,8 mm foram utilizados no trabalho para harmonizar os testes de inclinação de tubo de TP (van den Besselaar et al, 2020), mas tubos de 75 x 10 mm também podem ser utilizados. Os tubos de ensaio devem ser feitos de vidro borossilicato. Os tubos de ensaio devem ser descartados após o uso e não devem ser lavados para reutilização. Diferentes fontes de tubos de ensaio de vidro podem ser usadas com sucesso, mas podem influenciar os tempos de coagulação obtidos, particularmente em testes de triagem como TTPA. Se a fonte (fabricante ou composição) dos tubos de ensaio for alterada, deve-se considerar a possibilidade de que os resultados tenham sido influenciados. Isso pode ser avaliado comparando um pequeno número de testes, como o de TTPA, com os dois tipos de tubo. Se houver diferenças sistemáticas, uma nova faixa normal deve ser estabelecida.

Técnica:

- A temperatura do ambiente no qual o equipamento está instalado e onde a técnica será executada deve ser mantida em 20-22°C.
- Antes de iniciar os testes manuais de TP, TTPA, TT ou fibrinogênio em banho-maria, a temperatura deve ser verificada e posteriormente registrada.
- Os tubos de ensaio vazios devem ser mantidos na posição vertical em um suporte dentro do banho-maria, a 37°C por pelo menos 4 minutos a uma profundidade de 3,5 cm, antes da adição dos reagentes e do plasma.

TP pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo:

- Para o teste de TP, adicione 200 µL do reagente de tromboplastina/cálcio e incube por 2 minutos.
- Em seguida, pipete 100 µL de plasma não pré-aquecido, dispensando a uma altura de 1 cm acima do nível de tromboplastina, com a ponteira apoiada na parede do tubo de ensaio, e acione imediatamente o cronômetro com a outra mão.
- Agite o tubo suavemente para misturar o conteúdo, com o tubo imerso na água.
- Coloque o tubo no suporte dentro do banho-maria.
- Deite a pipeta.
- O tubo de ensaio deve ser mantido manualmente na água, com a água cobrindo 5 cm do fundo do tubo (Figura 1).
- A inclinação manual do tubo deve começar 7 segundos após o início do cronômetro.
- O tubo deve ser inclinado em um ângulo de aproximadamente 90°, retirando-o da água por 2 segundos e colocando-o novamente na água por 1 segundo (Figura 1). Observe que inclinar o tubo em 90° ou mais geralmente causará o derramamento da mistura de reação do tubo.
- O tubo não deve ficar parado durante esse ciclo, mas sim inclinado continuamente com a mão do operador apoiada na lateral do banho-maria.
- Esse ciclo é repetido até a formação do coágulo.
- Na posição horizontal, o tubo é mantido a uma altura não superior a 10 cm e não inferior a 2 cm acima do nível da água (Figura 1).
- Antes da mistura coagular, o operador observa a mistura fluindo do fundo para três quartos do comprimento do tubo na posição quase horizontal e retornando ao fundo.
- Quando a coagulação começa, a velocidade do fluxo é reduzida.
- Quando o fluxo é interrompido, o operador para o cronômetro e registra o tempo de coagulação em segundos com precisão de uma casa decimal.

O operador que executa a técnica de inclinação manual do tubo levanta o tubo de ensaio regularmente para fora da água. Retirar o tubo de ensaio da água resultará em uma queda de temperatura da mistura de reação. Imergir o tubo novamente na água resultará em um aumento de temperatura. A queda média de temperatura observada

na técnica de inclinação manual do tubo, utilizando o método descrito acima, é limitada a 0,4°C (van den Besselaar et al, 2020).

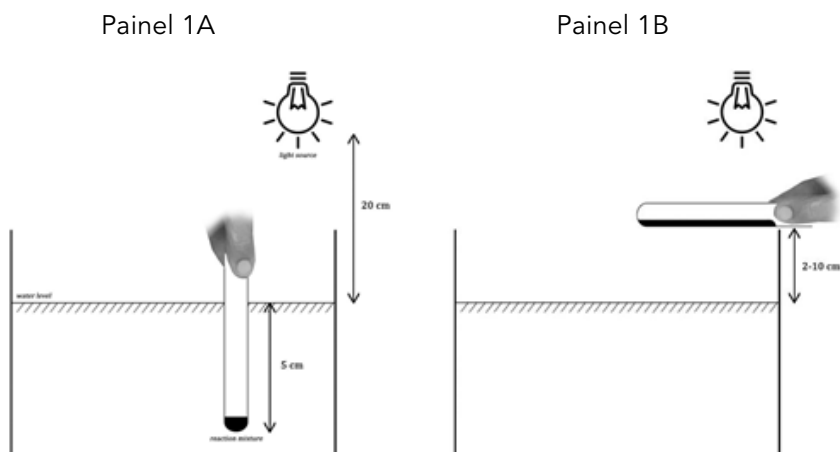


Figura 1. Representação esquemática da técnica de inclinação manual do tubo. Painel 1A: o tubo de ensaio está na posição vertical dentro do banho-maria. Painel 1B: o tubo de ensaio está na posição horizontal fora do banho-maria. A mão do operador está apoiada na borda do banho-maria. Devido à variação no tamanho das mãos dos operadores, a distância do tubo na posição horizontal até a superfície da água varia entre 2 e 10 cm. As dimensões da imagem não estão em escala. (Reproduzido com permissão da Elsevier Publishing, Amsterdã, Holanda, de: Van den Besselaar et al. J Thromb Haemost. 2020; 18: 1986-1994).

O método harmonizado acima foi desenvolvido em dois workshops, avaliando testes de TP por até sete operadores de três centros, que identificaram diversas variáveis na técnica (van den Besselaar et al, 2020). Em particular, os workshops confirmaram que a dispensação do componente final da mistura de reação para iniciar a coagulação no alto da parte de cima do tubo de ensaio estava associada a tempos de coagulação mais longos do que a dispensação próxima à superfície da mistura de reação na parte de baixo do tubo. Utilizando o método harmonizado descrito, o CV de Ts entre operadores nos mesmos plasmas de teste foi de 3% para TP normal e 1,4% para TP prolongado.

TTPA pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo:

- Adicione 100 µL de reagente de TTPA ao tubo e incube por 2 minutos.
- Em seguida, pipete 100 µL de plasma não pré-aquecido, dispensando a uma altura de 1 cm acima do nível do reagente de TTPA, com a ponteira apoiada na parede do tubo de ensaio, e acione imediatamente um cronômetro com a outra mão.
- Agite o tubo suavemente para misturar o conteúdo, com o tubo imerso na água.
- Coloque o tubo no suporte dentro do banho-maria.
- Após o tempo de ativação recomendado pelo fabricante do reagente de TTPA (geralmente 3 minutos, mas pode ser 5 minutos para outros), adicione 100 µL de cloreto de cálcio pré-aquecido a 37°C em um tubo separado no banho-maria, dispensando a uma altura de 1 cm acima do nível da mistura de reação, com a ponteira apoiada na parede do tubo de ensaio, e acione imediatamente um novo cronômetro com a outra mão.
- Agite o tubo suavemente para misturar o conteúdo, com o tubo imerso na água.
- Coloque o tubo no suporte dentro do banho-maria.
- Deite a pipeta.
- O tubo de ensaio deve ser mantido manualmente na água, com a água cobrindo 5 cm do fundo do tubo (Figura 1).
- A inclinação manual do tubo deve começar 15 segundos após o início do cronômetro.

- O tubo deve ser inclinado em um ângulo de aproximadamente 90°, retirando-o da água por 2 segundos e colocando-o novamente na água por 1 segundo (Figura 1). Observe que inclinar em 90° ou mais geralmente causará o derramamento da mistura de reação do tubo.
- O tubo não deve ficar parado durante esse ciclo, mas sim inclinado continuamente com a mão do operador apoiada na lateral do banho-maria.
- Esse ciclo é repetido até a formação do coágulo.
- Na posição horizontal, o tubo é mantido a uma altura não superior a 10 cm e não inferior a 2 cm acima do nível da água (Figura 1).
- Antes da mistura coagular, o operador observa a mistura fluindo do fundo para três quartos do comprimento do tubo na posição quase horizontal e retornando ao fundo.
- Quando a coagulação começa, a velocidade do fluxo é reduzida.
- Quando o fluxo é interrompido, o operador para o cronômetro e registra o tempo de coagulação em segundos com precisão de uma casa decimal.

Tempo de Trombina e Fibrinogênio pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo: os métodos de inclinação manual do tubo devem usar as proporções de reagentes e plasma ou diluições de plasma recomendadas pelo fabricante do reagente e seguir os princípios dos métodos descritos para TP/TTPA acima.

Amostras com lipemia: muitos coagulômetros em uso atualmente, que utilizam pontos finais foto-ópticos para análise, são muito tolerantes a altos níveis de lipídios nas amostras. No entanto, as amostras podem ocasionalmente apresentar um nível tão alto de lipídios que o analisador não consegue detectar a formação de coágulo. Essas amostras podem ser analisadas manualmente e geralmente produzem um coágulo sólido que pode ser observado visualmente para TP, TTPA e tempo de trombina. Pode ser difícil observar a formação de coágulo durante a análise de fibrinogênio de Clauss dessas amostras. Se esse for o caso, outra opção é submeter as amostras a centrifugação a 10.000 g por 10 minutos em temperatura ambiente, se disponível (orientação do ICSH; Kitchen et al, 2021). Após essa ultracentrifugação, o lipídio é sedimentado e a amostra pode ser analisada em um coagulômetro automatizado, se disponível, ou pela técnica de inclinação manual do tubo para TP, TTPA, tempo de trombina ou fibrinogênio.

Amostras com anormalidades de fibrinogênio: a formação de coágulo pode ser alterada na presença de algumas anormalidades de fibrinogênio. Por exemplo, o fibrinogênio Longmont está associado a um coágulo fraco e translúcido durante o ensaio de fibrinogênio de Clauss. Sistemas foto-ópticos que monitoram a luz espalhada à medida que o coágulo se forma (ao contrário do monitoramento de luz transmitida) podem não conseguir detectar o ponto final. Essas amostras podem ser analisadas pelo método de inclinação do tubo, mas o operador tem que saber que a formação do coágulo pode ser difícil de discernir visualmente. Para algumas amostras de disfibrinogenemia em que a análise automatizada não funciona, a técnica manual deve ser realizada com um escrutínio muito cuidadoso do processo de coagulação, visto que os coágulos podem ser frágeis e facilmente rompidos por mistura/inclinação adicional após a formação do coágulo inicial.

Controle de qualidade: o material de controle de qualidade descrito em outra parte deste manual para TP, TTPA, tempo de trombina e fibrinogênio é adequado para uso com métodos de teste manuais. É aceitável testar um único nível de CQI, sendo a técnica manual reservada para amostras ocasionais que não passam na análise automatizada. Dois níveis devem estar disponíveis e ser testados de acordo com os critérios descritos neste manual, sendo o teste manual o principal procedimento analítico no laboratório.

A variação dos resultados de CQI obtidos por um pequeno grupo de operadores experientes na técnica de inclinação manual do tubo deve ser tipicamente a seguinte:

Média de +/- 1 segundo para CQ com TP médio na faixa de 10 a 12 segundos,

Média de +/- 2,5 segundos para CQ com TTPA médio na faixa de 25 a 30 segundos,

Média de +/- 2,5 segundos para CQ com tempo de trombina médio na faixa de 12 a 20 segundos,

Média de +/- 0,5 g/L para CQ com fibrinogênio médio de 2,5 a 3 g/L

Faixas normais: os resultados de testes manuais geralmente são diferentes daqueles gerados por coagulômetros. Normalmente, os tempos de coagulação para TP e TTPA são menores em analisadores que usam foto-óptica para monitorar a coagulação em comparação com os resultados obtidos manualmente. O grau de diferença não é consistente entre os diferentes analisadores que podem usar luz transmitida ou espalhada. Os analisadores monitoram alterações na dispersão/transmissão de luz ao longo do tempo após o início da coagulação e registram o tempo de coagulação como o tempo necessário para ultrapassar um limiar específico de alteração. Pode ser um limiar baixo de 3% de alteração em relação ao valor basal ou um limiar alto de 50% de alteração. Quanto menor a % de alteração usada na análise da curva de coagulação, menor o tempo de coagulação relatado. Isso significa que os resultados dos testes manuais não devem ser relatados junto com a faixa de referência estabelecida para uma técnica automatizada, mesmo quando os mesmos reagentes forem usados. Existem duas opções para resolver esse problema. Uma é estabelecer uma faixa de referência para a técnica manual usando o processo descrito em outra parte deste manual. Isso deve ser feito se todos os testes no laboratório forem realizados com técnicas manuais. Mais frequentemente, o teste manual é restrito a um pequeno subgrupo de amostras em que a análise automatizada não funcionou. Nesse caso, a maioria dos resultados liberados pelo laboratório será divulgada com a faixa de referência automatizada relevante. É prejudicial para os usuários do serviço ver resultados ocasionais de TP ou TTPA divulgados com uma faixa de referência diferente. Nesse caso, o laboratório pode adotar uma abordagem pragmática e usar uma tabela de conversão conforme descrito abaixo, de modo que o teste é realizado por técnica manual, mas o resultado do teste é convertido no resultado que teria sido obtido se a amostra tivesse sido analisada pelo método automatizado.

Conversão de Resultados Manuais de TP, TTPA e Tempo de Trombina em Números Equivalentes Automatizados: uma série de 20 a 30 amostras, abrangendo uma faixa de resultados normais e anormais, deve ser testada usando métodos manuais e automatizados. Os dados devem ser analisados por meio de análise de regressão para estabelecer a relação entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Deve haver uma correlação significativa entre os resultados, com coeficiente de correlação $>0,8$. Nesse caso, a relação de regressão pode ser usada para criar uma tabela que mostre o resultado manual e o resultado equivalente que teria sido obtido no sistema automatizado. Quando um teste manual é realizado, o resultado manual é convertido no resultado automatizado, que é então relatado junto com a faixa de referência habitual do método automatizado. Isso significa que os usuários do serviço verão apenas uma única faixa de referência para TP, TTPA ou tempo de trombina. Isso é importante, pois essas faixas de referência provavelmente serão incorporadas aos protocolos clínicos utilizados no manejo de pacientes. A Tabela 5 mostra os resultados manuais e automatizados obtidos testando as mesmas 21 amostras com os dois métodos.

Tabela 5. TTPAs manuais e automatizados nas mesmas amostras

Número da amostra	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	Número da amostra	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
1	31,7	27,0	12	31,7	30,1
2	51,1	46,9	13	31,9	28,9
3	27,2	26,5	14	36,2	33,2
4	42,2	39,4	15	33,1	28,5
5	34,5	30,4	16	40,0	36,4
6	44,2	43,2	17	37,1	30,7
7	33,0	30,5	18	29,2	25,6
8	31,9	30,0	19	35,2	28,1
9	22,2	19,6	20	37,1	34,7
10	34,0	27,8	21	36,5	31,4
11	32,5	31,3			

A relação de regressão linear entre os dois conjuntos de dados é calculada usando um pacote estatístico. Nesse exemplo, o coeficiente de correlação (r) é 0,96 e a relação de regressão é calculada como:

$$y = 0,9551x - 1,887$$

onde

y é o TTPA automatizado

x é o TTPA manual

0,9551 é a inclinação da reta de regressão linear

- 1,887 é o intercepto em y.

Essa equação é usada para obter o TTPA automatizado a partir do TTPA determinado manualmente de qualquer amostra de teste. É conveniente elaborar uma tabela relacionando o TTPA manual ao resultado equivalente automatizado. A Tabela 6 foi derivada com o uso da equação de regressão acima.

Tabela 6. Tabela de conversão: TTPA manual para TTPA equivalente automatizado

TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
19	16,3	40	36,3	61	56,4
20	17,2	41	37,3	62	57,3
21	18,2	42	38,2	63	58,3
22	19,1	43	39,2	64	59,2
23	20,1	44	40,1	65	60,2
24	21,0	45	41,1	66	61,2
25	22,0	46	42,0	67	62,1
26	22,9	47	43,0	68	63,1
27	23,9	48	44,0	69	64,0
28	24,9	49	44,9	70	65,0
29	25,8	50	45,9	71	65,9
30	26,8	51	46,8	72	66,9
31	27,8	52	47,8	73	67,8
32	28,7	53	48,7	74	68,8
33	29,6	54	49,7	75	69,8
34	30,6	55	50,7	76	70,7
35	31,5	56	51,6	77	81,7
36	32,5	57	52,6	78	82,6
37	33,4	58	53,5	79	73,6
38	34,4	59	54,5	80	74,5
39	35,4	60	55,4		

Ensaio manual de fibrinogênio de Clauss: os reagentes e métodos utilizados no ensaio manual de fibrinogênio de Clauss são os mesmos da versão automatizada (ou seja, mesma diluição de tampão, trombina e amostra de teste). O tempo de coagulação dos testes manuais é convertido em concentração de fibrinogênio usando uma curva de calibração. A curva de calibração deve ser construída com o mesmo calibrador e as mesmas diluições de calibrador que seriam usados nos testes automatizados (consulte a seção sobre ensaio de Clauss em outra parte deste manual), mas os tempos de coagulação de cada diluição de calibrador usada para construir a curva de calibração são determinados manualmente. Os resultados são, portanto, convertidos em concentração de fibrinogênio e o resultado é relatado no mesmo formato da versão automatizada (g/L ou mg/dL), usando a mesma faixa de referência do método de Clauss automatizado no mesmo centro.

Referências

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

van den Besselaar A, van Rijn CJJ, Abdoel CF, Chantarangkul V, Scalabrino E, Kitchen S, Tripodi A, Woolley AM, Padovan L, Cobbaert CM. Paving the way for establishing a reference measurement system for standardization of plasma prothrombin time: Harmonizing the manual tilt tube method. *J Thromb Haemost* 2020; 18(8): 1986-1994.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Teste de Tempo de Sangramento
 - ✓ Tempo de Protrombina (TP)
 - ✓ Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)
 - ✓ Testes de Mistura para Investigação Adicional de TP e TTPA Anormais
 - ✓ Tempo de Coagulação da Trombina
 - ✓ Tempo de Trombina na Presença de Sulfato de Protamina para Detectar a Presença de Heparina
 - ✓ Tempo de Reptilase
 - ✓ Fibrinogênio (Ensaio de Clauss Modificado)
 - ✓ Remoção de Heparina do Plasma
-

Teste de Tempo de Sangramento: o teste de tempo de sangramento foi historicamente desenvolvido para avaliar pré-operatoriamente a capacidade dos pacientes de manter um padrão de sangramento normal durante procedimentos cirúrgicos de grande porte ou em pacientes com suspeita de distúrbio hemorrágico causado por disfunção plaquetária. Infelizmente, foi confirmado que o teste é irreprodutível e insensível e, portanto, se necessário, deve ser utilizado em combinação com histórico familiar e clínico abrangente, acompanhado de testes de triagem de coagulação, incluindo contagem e morfologia plaquetária. O PFA 100/200 substituiu amplamente o teste de tempo de sangramento na avaliação da função plaquetária, apesar de suas inadequações observadas em pacientes trombocitopênicos (Rodgers and Levin, 2023; Undas, 2023).

O tempo de sangramento é o tempo necessário para que um corte na pele padronizado, de profundidade e comprimento fixos, pare de sangrar. Prolongamento do tempo de sangramento ocorre em pacientes com trombocitopenia, doença de von Willebrand (DWW) tipo 3 e tipo 2B, trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier, doença do pool de armazenamento, outros distúrbios plaquetários, sepse (Williams et al, 2024), doenças autoimunes, deficiência de vitaminas, anemia grave, malignidades hematológicas (por exemplo, distúrbios mieloproliferativos que resultam em deficiência de fator V) e reação a medicamentos (Vinholt et al, 2019). O fibrinogênio é necessário para interromper o sangramento, e foi sugerido um papel do FV. O tempo de sangramento pode, portanto, ser prolongado em pacientes com deficiência de fibrinogênio ou FV. Prolongamento do tempo de sangramento também ocorre em alguns pacientes com doença renal, disproteinemias e distúrbios vasculares (Russeau et al, 2023; Bourguignon et al, 2022).

Materiais e equipamentos:

- ✓ Esfigmomanômetro
- ✓ Swabs para assepsia
- ✓ Medidor de tempo de sangramento
- ✓ Papel filtro com 1 mm de espessura
- ✓ Cronômetro

Método:

- ✓ O manguito do esfigmomanômetro é colocado ao redor da parte superior do braço, posicionado na altura do coração, e inflado a 40 mm de mercúrio. Essa pressão é mantida durante todo o teste.
- ✓ A superfície dorsal do antebraço é limpa e o medidor de tempo de sangramento é colocado firmemente contra a pele, sem pressionar. O gatilho é pressionado e o cronômetro é acionado.
- ✓ Veias superficiais, cicatrizes e hematomas devem ser evitados.

- ✓ Em intervalos de 30 segundos, seque o fluxo de sangue com papel filtro. Aproxime o papel filtro das incisões, sem tocar a borda da ferida.
- ✓ Registre o tempo desde a punção até a interrupção do sangramento.

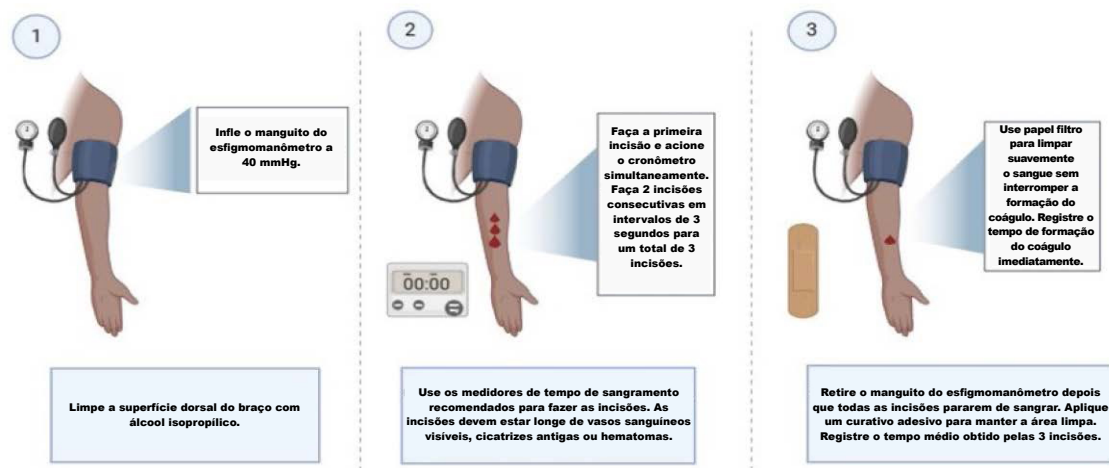


Figura 2. Diagrama de fluxo demonstrando o teste de tempo de sangramento. (Adaptado do modelo de Sally Kim de “Medição da pressão arterial: método auscultatório” em biorender.com.)

Interpretação: a faixa normal em adultos é de 2 a 7 minutos (até 8 minutos), mas pode variar de acordo com o método utilizado.

Observações: a faixa normal deve ser estabelecida localmente, independentemente do dispositivo utilizado. A incisão deve ser feita paralelamente ao comprimento do braço. Cortes feitos na perpendicular sangram por mais tempo. Um resultado anormal deve ser repetido. Não é necessário registrar os pontos finais se o sangramento continuar por mais de 20 minutos. O efeito de medicamentos que interferem na função plaquetária deve ser considerado. Por exemplo, medicamentos que contêm aspirina podem causar prolongamento. Portanto, sempre que possível, eles não devem ser tomados por sete dias antes do teste. Há a possibilidade de cicatrizes e, às vezes, formação de hematoma no local das incisões do teste de tempo de sangramento. Isso deve ser comunicado aos pacientes antes da realização da incisão. O tempo de sangramento em gestantes pode ser enganoso em razão dos níveis fisiologicamente elevados de FVIII e VWF. O manguito do esfigmomanômetro utilizado deve ser calibrado regularmente, de acordo com as diretrizes de padrões de qualidade em vigor. O método de Duke para tempo de sangramento apresenta maior taxa de inexatidão, com risco aumentado de desenvolvimento de hematoma (Russeau et al, 2023). Como o teste de tempo de sangramento é realizado à beira do leito, todos os procedimentos padrão relativos aos requisitos de qualidade de POCT devem ser aplicados para promover a segurança dos pacientes (ISO 15189:2022). Caso haja suspeita de DVW em um paciente e seu laboratório tenha capacidade para isso, os seguintes testes/ensaios devem ser realizados, juntamente com a obtenção de histórico abrangente de sangramento: antígeno FVII, atividade do FVII, ensaio de FVIII, hemograma completo (incluindo contagem e morfologia plaquetária) e testes básicos de triagem de coagulação (TP, TTPA, TT, fibrinogênio). Esses testes/ensaios permitiriam uma melhor compreensão do possível diagnóstico clínico na ausência do tempo de sangramento ou de um laboratório especializado em coagulação capaz de fazer o diagnóstico definitivo de DVW.

Tempo de Protrombina (TP): o TP avalia a integridade do sistema extrínseco. É muito útil na detecção de deficiências de fatores de coagulação, que podem ser qualitativas ou quantitativas, das vias extrínseca e comum. Também é útil para monitorar anticoagulantes antagonistas da vitamina K (VKA), como a varfarina, e detectar doenças hepáticas, deficiência de vitamina K, deficiência de FX causada por amiloidose, coagulação intravascular disseminada (CIVD), presença de anticoagulantes orais diretos (DOACs) de forma dose-dependente ou anticorpos contra fatores da via extrínseca. Essas condições podem prolongar os resultados do teste de TP (Dorgalaleh et al, 2021). O TP é sensível a alterações nos fatores V, VII e X, e menos ao FII (protrombina). É inadequado para detectar pequenas alterações no nível de fibrinogênio, pois os resultados podem ser anormais se o nível de fibrinogênio estiver muito baixo ou

se um inibidor estiver presente. A sensibilidade do teste é influenciada pelos reagentes e pela técnica utilizados, sendo importante estabelecer uma faixa de referência localmente. A via medida pelo TP é mostrada na Figura 3. O reagente de TP, frequentemente denominado tromboplastina, contém fator tecidual e fosfolipídios. Muitos reagentes adequados estão disponíveis comercialmente.

Reagentes:

- ✓ Tromboplastina (pode conter cloreto de cálcio)
- ✓ Cloreto de cálcio 25 mM (necessário apenas se o reagente tromboplastina não contiver cálcio)

Método: a técnica de inclinação manual do tubo é descrita na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas. Ao utilizar um novo reagente tromboplastina com número de lote diferente do anterior, uma nova curva de calibração deve ser traçada.

Interpretação: os tempos de coagulação normalmente são influenciados pelo uso de diferentes coagulômetros, dependendo de como e quando o ponto final é detectado. Isso enfatiza ainda mais a importância de estabelecer faixas normais para o método atualmente em uso no laboratório e com base na população local. Na presença de deficiências leves dos fatores II, V, VII ou X, o grau de prolongamento pode ser mínimo. No caso de deficiência de FII, o TP pode estar dentro da faixa normal. Alguns reagentes de TP podem ser afetados pela presença de anticoagulantes lúpicos/ anticorpos antifosfolipídios, e alguns tipos raros de anticorpos podem prolongar o TP sem nenhum prolongamento do TTPA. Reagentes com concentrações mais baixas de fosfolipídios têm maior probabilidade de serem afetados, inclusive alguns reagentes construídos pela lipidação do fator tecidual recombinante. A presença de FVII ativado, seja após terapia com FVIIa recombinante ou quando o FVII original foi ativado, pode encurtar o TP. O efeito depende do reagente de fator tecidual utilizado. Reagentes que contêm fator tecidual bovino são particularmente suscetíveis a esse efeito (Kitchen et al, 1992). O sangue total para determinação do TP pode permanecer estável por pelo menos 24 horas, dependendo do reagente usado (Baglin and Luddington, 1997). Os TPs determinados com reagentes contendo fator tecidual humano podem ser diferentes daqueles obtidos com reagentes contendo fator tecidual de outras espécies, como de coelho. Nesses casos, o resultado obtido com reagentes de fator tecidual humano pode ser mais indicativo de risco de sangramento. Para uma discussão completa sobre questões relacionadas à determinação do TP, leia as diretrizes vigentes do CLSI sobre TP e TTPA de um estágio (2023).

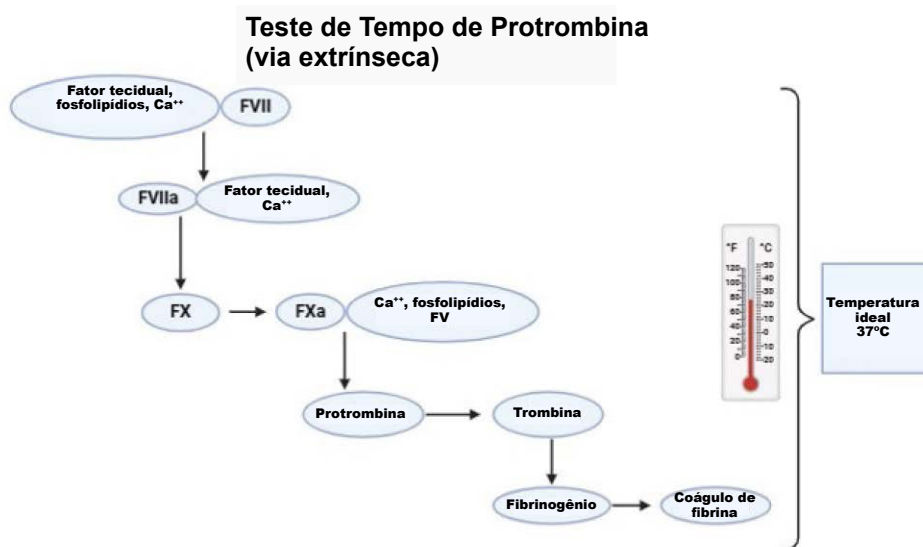


Figura 3. Via medida pelo teste de TP

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA): esse é um ensaio baseado na formação de coágulo que auxilia na identificação de deficiências de fatores de coagulação ou inibidores das vias intrínseca e comum. Em conjunto com o tempo de protrombina normal, é o teste de triagem mais útil para detectar deficiências dos fatores VIII, IX, XI e XII. O TTPA também será prolongado em qualquer deficiência que envolva as vias comuns (deficiências dos fatores V, X e II e fibrinogênio) e na presença de inibidores. A presença de alguns inibidores terapêuticos da coagulação, como a heparina, também prolongará o TTPA. É importante excluir a possibilidade de que esses tratamentos tenham sido utilizados na investigação inicial de TTPA prolongado. O TTPA é prolongado na presença de deficiência de PKK ou HMWK, a menos que o teste seja realizado com um reagente que contenha ácido elágico como ativador (Turi, 1986). Nesse caso, o TTPA será normal, mesmo na ausência completa desses fatores. É aconselhável observar que cada laboratório deve determinar suas faixas normais de TTPA com base na população local, no tipo de reagente de TTPA e no coagulômetro em uso. O reagente de TTPA contém fosfolípidios diluídos e ativadores de contato, como sílica, ácido elágico e caulim. Este é adicionado ao plasma citratado pobre em plaquetas a 37°C. Essa mistura é incubada a 37°C por um período específico para permitir a ativação dos fatores de contato. Em seguida, a adição de cloreto de cálcio leva à formação do coágulo de fibrina. O tempo necessário para a formação do coágulo é registrado em segundos. A via medida pelo TTPA é mostrada na Figura 4.

Reagentes:

- ✓ Reagente de TTPA
- ✓ Cloreto de cálcio 25 mM

Método: a técnica de inclinação manual do tubo é descrita na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas.

Interpretação: a faixa normal deve sempre ser estabelecida localmente. TTPA longo com TP normal indica uma possível deficiência dos fatores VIII, IX, XI, XII, HMWK, PKK ou a presença de um inibidor. Em casos de TTPA longo, uma mistura igual de plasma normal e de teste deve ser testada (ou seja, mistura de 1 parte de plasma de teste para 1 parte de plasma normal, chamada de mistura 50:50, abaixo). Se o TTPA corrigir em mais de 50% a diferença entre os tempos de coagulação do plasma normal e de teste, deficiência de fator é indicada (os detalhes são descritos no tópico específico a seguir). Correção inadequada sugere um inibidor, possivelmente de um dos fatores de coagulação no sistema ou do tipo não específico, como o anticoagulante lúpico.

Tabela 7. Exemplo de interpretação de TTPA prolongado

Amostra	Resultado
Controle de TTPA	35 segundos
Teste	60 segundos
Em caso de mistura 50:50	42 segundos (essa é uma boa correção, então provavelmente há deficiência de fator)
Em caso de mistura 50:50	52 segundos (essa é uma correção inadequada, então provavelmente há presença de um inibidor)

Investigação de TTPA prolongado isolado: para pacientes com TP normal e TTPA prolongado, a sequência normal de investigação a ser seguida é:

- ✓ Determinar o tempo de trombina. Se estiver normal, prosseguir com as etapas seguintes. Se o tempo de trombina estiver prolongado, repetir o teste na presença de sulfato de protamina. Se o tempo de trombina for corrigido para o normal, isso sugere a presença de heparina e os testes adicionais abaixo não são necessários. Se não houver conhecimento de que o paciente esteja recebendo heparina de qualquer tipo, deve-se solicitar uma amostra repetida.
- ✓ Determinar o TTPA em misturas de plasma normal e de paciente usando uma mistura 1:1 (50%) de normal:paciente. A falha da mistura de 50% em corrigir o TTPA para o normal pode indicar a presença de um inibidor (detalhes são descritos abaixo).

- ✓ Determinar o TTPA com um segundo reagente que contenha fosfolipídios em alta concentração, como o Actin FS (Dade Behring). Se o TTPA inicial estiver claramente prolongado (pelo menos três segundos acima do limite superior do normal em uso) e o Actin FS estiver normal, a causa provável é o anticoagulante lúpico. Isso pode ser confirmado posteriormente por testes específicos, como o tempo de veneno de víbora de Russell diluído, embora normalmente não seja necessário na ausência de qualquer necessidade de investigar a possibilidade de o anticoagulante lúpico ser um fator de risco para trombose. Muito raramente, deficiência de PKK é a outra causa possível de TTPA normal com Actin FS e prolongamento acentuado do TTPA com um reagente que utiliza sílica ou caulim como ativador. Como na maioria dos casos de anticoagulante lúpico, isso não está associado a nenhum risco de sangramento. Portanto, novamente, a confirmação pode não ser necessária. Quando o TTPA inicial estiver claramente prolongado (três ou mais segundos) e o TTPA com Actin FS estiver normal, não há necessidade de realizar ensaios de fatores.
- ✓ Se ambos os TTPAs estiverem prolongados, realizar os ensaios de FVIII:C, FIX e FXI. Um ensaio de FXII pode ser realizado, se necessário, visto que a deficiência é relativamente comum e sua detecção pode explicar o prolongamento do TTPA. Isso não é necessário para excluir a presença de um distúrbio hemorrágico, uma vez que a deficiência de FXII não está associada a risco aumentado de sangramento.
- ✓ Reagentes como Actin FS, que utilizam ácido elágico como ativador de contato, estão associados a resultados normais na presença de deficiência até mesmo grave de PKK.

Observações: muitos reagentes adequados estão disponíveis comercialmente. Estes incluem materiais com diferentes sensibilidades. Quanto ao TP, os tempos de coagulação podem ser influenciados pelo uso de coagulômetro. Historicamente, pesquisas comprovam que há muita variabilidade nos testes de TTPA, conforme observado na variação dos resultados de diferentes reagentes, variações dos resultados de diferentes coagulômetros e variação dos resultados de testes de amostras semelhantes em diferentes laboratórios. Essas evidências indicam a necessidade de aderir ao estabelecimento de faixas normais locais para coagulômetros e reagentes de TTPA específicos. Em plasmas de teste, altos níveis de um fator de coagulação podem compensar níveis mais baixos de outros fatores. Por exemplo, FVIII acentuadamente elevado durante uma reação de fase aguda pode ocasionar TTPA normal na presença de reduções de FIX ou FXI, o que pode ser clinicamente importante. Se um paciente tiver histórico pessoal ou familiar adequado sugestivo de distúrbio hemorrágico, investigações adicionais, incluindo ensaios de fatores específicos, podem ser justificadas na presença de TTPA normal, particularmente se o resultado estiver na parte superior da faixa de referência. A concentração de fosfolipídios varia muito entre os reagentes. Esse é um dos motivos pelos quais os reagentes variam demais na sensibilidade à presença de anticoagulantes lúpicos. Se um reagente sensível ao lúpus for usado para o TTPA inicial, é útil realizar um segundo teste de TTPA usando um reagente como Actin FS (Dade Behring, Marburg, Alemanha), que possui uma concentração muito alta de fosfolipídios (Kitchen et al, 1999). Se o prolongamento com o primeiro reagente for causado por anticoagulante lúpico, o segundo TTPA é quase sempre normal, visto que poucos anticoagulantes lúpicos prolongam o TTPA quando Actin FS é usado.

TTPA normal com Actin FS, combinado com TTPA inicial prolongado, normalmente exclui a presença de deficiência de FVIII, FIX ou FXI e, nesse caso, não há necessidade de ensaios de fatores. Raramente, TTPA normal com qualquer reagente pode ocorrer quando FIX ou FXI estiver levemente reduzido (30 a 50 U/dL) e FVIII estiver acentuadamente elevado. O TTPA com Actin FS é frequentemente normal quando FXII está reduzido na faixa de 20 a 50 U/dL e o TTPA com ativação à base de caulim ou sílica está levemente elevado. Esse defeito não tem relevância clínica. Alguns anticoagulantes lúpicos potentes prolongam o TTPA com Actin FS. Anticorpos específicos contra FVIII, FIX ou FXI prolongam o TTPA, independentemente do reagente. Para uma discussão completa sobre questões relacionadas à determinação do TTPA, consulte CLSI (2023).

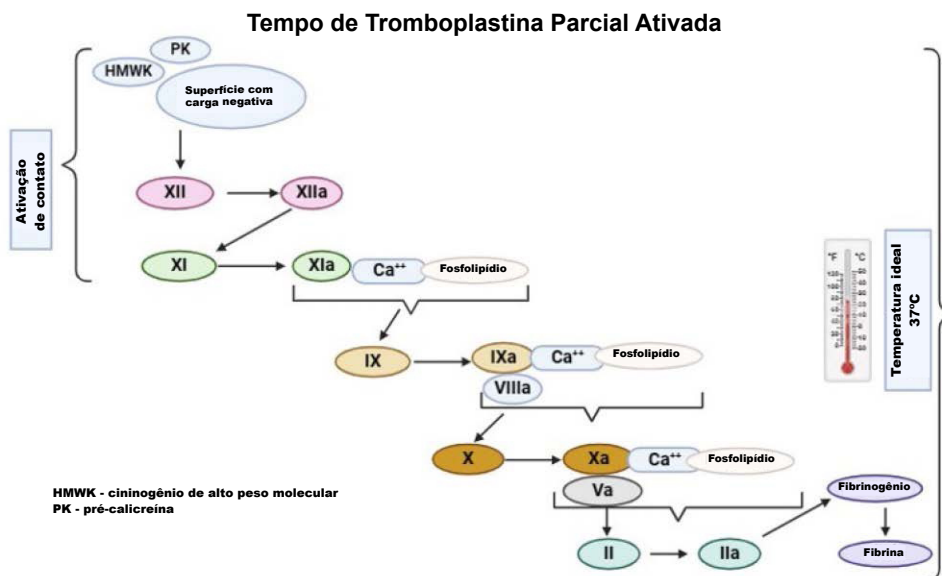


Figura 4. Via medida pelo TTPA

Testes de Mistura para Investigação Adicional de TP e TTPA Anormais: testes de mistura são amplamente realizados quando o TP ou TTPA basal está prolongado e a causa do prolongamento precisa ser identificada para que testes adicionais possam ser realizados a fim de chegar a um diagnóstico. Muita variabilidade tem sido identificada na forma como os testes de mistura são realizados e interpretados. O conhecimento sobre deficiências de fatores e comportamento de inibidores em estudos de mistura é fundamental, além dos fatores que podem influenciar o desempenho e a interpretação dos testes de mistura (Figura 5) (Favaloro, 2020; Adcock et al, 2023). Plasma do paciente e PNP são misturados em partes iguais (ou seja, 50:50) e o teste previamente prolongado é realizado nessa mistura. Os controles apropriados (PNP misturado com plasma contendo inibidor e PNP misturado com plasma contendo deficiência de fator) devem ser utilizados. Existem vários métodos de interpretação e cada laboratório deve estabelecer suas próprias faixas de corte. Cada laboratório também deve estabelecer os intervalos de referência normais para TP e TTPA com base na população local para orientar a interpretação exata dos resultados (Adcock et al, 2023).

Procedimento:

- ✓ Misture partes iguais de PNP e plasma do paciente (50:50) e prepare para o teste previamente prolongado (TTPA será aplicado nesse caso).

Se o resultado do TTPA obtido a partir da mistura de plasma de controle normal e do paciente for corrigido em comparação com o resultado do TTPA prolongado original, testes de mistura adicionais podem ser realizados para identificar o fator deficiente no paciente. Um segundo lote de testes de mistura pode ser realizado com o uso de um tubo contendo uma mistura de plasma do paciente e plasma deficiente em FVIII em partes iguais, e um segundo tubo contendo uma mistura igual de plasma deficiente em FIX com plasma do paciente. O teste de TTPA é realizado em ambas as misturas. O resultado do TTPA que apresentar correção indica deficiência de FVIII ou FIX (Tabela 8).

Essas duas misturas são realizadas somente se o histórico clínico do paciente for sugestivo de deficiência de fatores da via intrínseca em laboratórios que não têm capacidade para realizar ensaios de fatores.

Interpretação dos testes de mistura: se o TTPA corrigir em mais de 50% a diferença entre os tempos de coagulação do plasma normal e de teste, deficiência de fator é indicada, como já discutido. Correção inadequada sugere um inibidor, possivelmente de um dos fatores de coagulação no sistema ou do tipo não específico, como o

anticoagulante lúpico. Também podemos usar o cálculo da porcentagem (%) de correção para interpretação do teste de mistura, como mostrado abaixo.

$$(\%) \text{ Correção} = \frac{(\text{TTPA do paciente} - \text{TTPA da mistura})}{(\text{TTPA do paciente} - \text{TTPA do NPP})} \times 100$$

Correção = % do valor está acima/é igual ao ponto de corte estabelecido localmente

Sem correção = % do valor está abaixo do ponto de corte estabelecido localmente

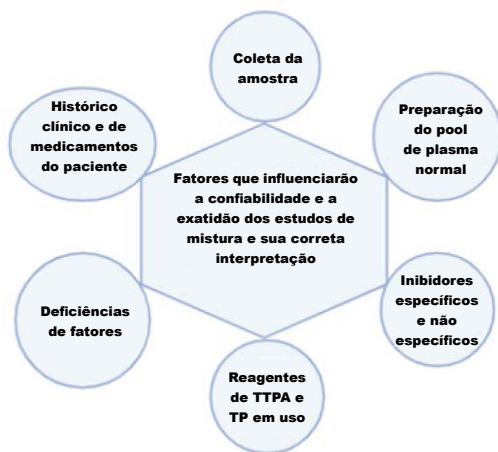


Figura 5. Diagrama desenvolvido em biorender.com usando informações obtidas de Adcock et al.

Conforme destacado em Adcock et al (2023), existem vários fatores que influenciam a exatidão dos testes de mistura. Um fator importante é conhecer o histórico clínico e de medicamentos do paciente. Outros fatores importantes incluem se a coleta da amostra foi realizada de acordo com os padrões aceitos, se o paciente tem histórico prévio de deficiência de fator, o tipo de reagentes usados e sua sensibilidade (especialmente a deficiências leves de fatores e inibidores), o estabelecimento de intervalos de referência normais para testes de triagem usando amostras normais da população local, a preparação do pool de plasma normal e os níveis de concentração de fatores de coagulação (pelo menos 80%) e se os inibidores específicos ou não específicos são de natureza endógena ou exógena. A melhor compreensão desses fatores aumentará a capacidade dos laboratórios de interpretar corretamente os resultados dos testes de mistura.

Plasma deficiente em FVIII/FIX para estudo de mistura: plasma de pacientes com deficiência grave isolada (<1 UI/dL) de FVIII ou FIX é muito útil para estudos de mistura. O plasma selecionado para esse propósito deve ter TP normal, confirmando que os outros fatores de coagulação sintetizados no fígado provavelmente estão em níveis normais. Esses plasmas podem ser liofilizados para armazenamento de longo prazo ou armazenados como plasma a -35°C (ou menos) por pelo menos três meses. Utilizando misturas 50:50 de aditivo e plasma do paciente, uma anormalidade pode ser caracterizada. Nas situações em que há prolongamento isolado do TTPA, plasma deficiente em FVIII é preferível ao plasma envelhecido. Da mesma forma, plasma deficiente em FIX é preferível ao plasma adsorvido.

É ético obter o consentimento livre e esclarecido do paciente antes de coletar uma amostra para uso em testes de mistura. O status de inibidor negativo deve ser estabelecido antes da coleta de amostras para testes de mistura.

Tabela 8. Padrão de resultados de testes de mistura na presença de deficiências de fatores individuais

Defeito no plasma de teste	TTPA	Deficiente em FVIII	Deficiente em FIX	Plasma normal
FVIII	anor	sem corr	corr	corr
FIX	anor	corr	sem corr	corr
FXI/FXII	anor	corr	corr	corr
Inibidor	anor	sem corr	sem corr	sem corr

Defeito no plasma de teste	TP	TTPA	Plasma normal
FII	anor	anor	corr
FV	anor	anor	corr
FVII	anor	norm	corr
FX	anor	anor	corr

anor = anormal; sem corr = sem correção; corr = correção

Observações: a amostra para coagulação deve conter contagem de plaquetas $<10 \times 10^9/L$ para proporcionar um teor mínimo de fosfolípidios e permitir a detecção de anticoagulantes lúpicos fracos (Toulon et al, 2016). Os estudos de mistura devem ser realizados apenas no mesmo plasma que forneceu um resultado prolongado. Se, por algum motivo, uma nova amostra for coletada do paciente, o teste basal anormal deve ser repetido antes da realização do teste de mistura. Validação e verificação de novos reagentes com novos números de lote devem ser sempre realizadas para garantir que a sensibilidade do reagente a inibidores e deficiências de fatores ainda esteja na faixa aceitável (Toulon et al, 2016). Todas as amostras para coagulação devem ser coletadas conforme descrito na Parte 3 deste manual. Inibidores não específicos que afetam o TTPA (por exemplo, anticoagulante lúpico) geralmente não mostram correção, embora plasmas contendo inibidores mais fracos ou de baixo título possam ser parcialmente corrigidos por plasma normal.

Inibidores específicos contra o FVIII: inibidores específicos contra o FVIII podem estar associados à ausência de correção imediata do TTPA após a adição de plasma normal. Em outros casos, há uma correção imediata por plasma normal, seguida de prolongamento do TTPA na mistura ao longo do tempo. Uma mistura de plasma de teste e normal deve ser testada após uma hora a 37°C, juntamente com determinações do TTPA em plasmas normal e de teste que foram incubados separadamente ao mesmo tempo. Inibidores específicos contra outros fatores de coagulação são particularmente raros, mas podem ocorrer. Não é possível generalizar seu comportamento em experimentos de mistura, exceto que os inibidores de FIX são tipicamente de ação rápida. A Figura 6 mostra como o TTPA muda quando 20% e 50% de PNP são adicionados a amostras de indivíduos com hemofilia A adquirida com anticorpos anti-FVIII. O limite superior da faixa normal para este método de TTPA foi de 37 segundos. Esse exemplo ilustra que, na presença de anticorpos anti-FVIII, pode haver correção total em uma mistura 50:50 de plasma de paciente e PNP em alguns casos. Se essas misturas forem incubadas a 37°C, há um aumento progressivo no TTPA, pois os anticorpos anti-FVIII inibem o FVIII. O ensaio de Nijmegen Bethesda é o teste “padrão ouro” na quantificação de inibidores presentes em uma amostra de plasma após triagem positiva. O ensaio cromogênico de Bethesda é o teste de escolha para avaliar inibidores em pacientes em uso de emicizumabe, pois os resultados da triagem de inibidores com base no TTPA são sabidamente menores em pacientes em uso de emicizumabe (Lowe et al, 2020). Inibidores de outros fatores de coagulação, como os inibidores de FXa, podem ser detectados por meio de ensaio de atividade anti-FXa.

Tabela 9. Estudos de mistura em hemofilia A adquirida

Título de Bethesda (U/mL)	TTPA (segundos)	TTPA + 20% de plasma normal (segundos)	TTPA + 50% de plasma normal (segundos)
1,0	210	137	77
1,1	83	52	38
2,0	82	43	34
6,6	107	51	37
8,4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

Tempo de Coagulação da Trombina: o tempo de coagulação da trombina (também conhecido como tempo de trombina) é útil na identificação de anormalidades hereditárias de fibrinogênio, bem como anormalidades quantitativas ou qualitativas adquiridas. Sabe-se que o tempo de trombina é muito sensível à presença de heparina ou de medicamentos como inibidores diretos da trombina (DTIs) (Bonar et al, 2017). O tempo de trombina reflete a reação entre a trombina e o fibrinogênio. Ele é prolongado quando o nível de fibrinogênio é muito baixo (menos de 1,0 g/L); na presença de heparina, substâncias semelhantes à heparina, DTIs ou outros inibidores (por exemplo, produtos de degradação de fibrina/fibrinogênio [FDPs]); e quando o fibrinogênio é qualitativamente anormal (disfibrinogenemia), incluindo defeitos congênitos e adquiridos secundários a doença hepática (Mackie et al, 2024).

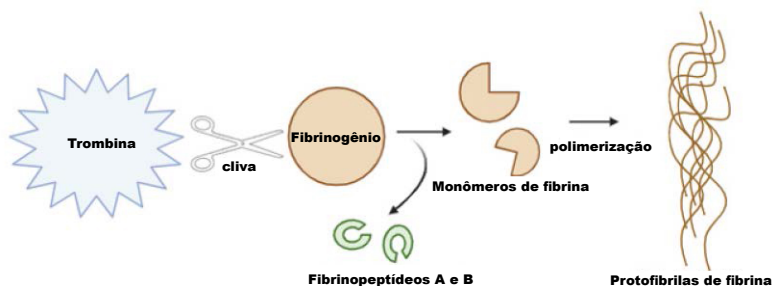


Figura 6. Diagrama de fluxo representando a conversão de fibrinogênio em fibrina na presença de trombina. Desenvolvido com o uso de Biorender.

Reagentes:

- ✓ Solução de trombina, que induz a coagulação do plasma normal em cerca de 15 segundos.
- ✓ Soluções mais fortes proporcionam tempos de coagulação mais curtos e podem ser normais na presença de defeitos leves.

Existem diversos reagentes de trombina disponíveis comercialmente. Alguns possuem dois níveis de diluição de reagente de trombina com o tampão para triagem, e uma terceira concentração de reagente de trombina para amostras com alto teor de heparina, sugestivo de paciente em uso de heparina terapêutica. Como de costume, recomenda-se seguir as instruções do fabricante, e faixas de referência normais locais devem ser estabelecidas pelo laboratório.

Método: o método de inclinação manual do tubo é descrito na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas.

Observações: a concentração de trombina utilizada deve ser aquela que proporcione um tempo de coagulação de aproximadamente 15 segundos com PNP (controle). Se for utilizada trombina concentrada, ela deve ser diluída para

cerca de 10 a 15 U/mL em solução salina e posteriormente diluída conforme necessário, até que o tempo de controle apropriado seja obtido. Para todos os reagentes de trombina adquiridos comercialmente, as instruções do fabricante sobre reconstituição, uso e armazenamento devem ser seguidas. A trombina reconstituída pode ser armazenada a -35°C ou menos e diluída antes do uso. A trombina diluída mantida em temperatura ambiente se deteriorará. Controle de PNP deve ser incluído em cada grupo de testes. Amostras de plasma para tempo de trombina devem ser testadas em até 4 horas após a coleta e em até 2 horas se houver suspeita da presença de heparina. Altos níveis de heparina na amostra de um paciente sendo testada para tempo de trombina causarão ausência da formação de coágulo. Isso também é possível com alguns DTIs, como a dabigatrana. Use o teste de tempo de reptilase para confirmar a presença de DTIs ou contaminação/presença de heparina na amostra do paciente. Houve variação nos resultados dos métodos de tempo de trombina com base no tipo de reagente e no instrumento de coagulação utilizado; portanto, recomenda-se que o resultado de cada paciente seja relatado junto com a faixa de referência específica para aquele reagente e instrumento.

Tempo de Trombina na Presença de Sulfato de Protamina para Detectar a Presença de Heparina: a presença de HNF pode causar prolongamento do tempo de trombina. As formas maiores de heparina, que prolongam o tempo de trombina, podem ser neutralizadas pela adição de sulfato de protamina. Sulfato de protamina está disponível em muitas farmácias hospitalares, onde é usado como agente terapêutico para reverter o efeito da heparina. A concentração do medicamento em preparações terapêuticas é normalmente muito maior do que a utilizada para fins de testes laboratoriais. Portanto, se necessário, o medicamento deve ser diluído em solução salina até uma concentração de 40 mg% como solução de trabalho. A solução de trabalho de trombina com sulfato de protamina é preparada misturando nove partes de reagente de trombina com uma parte de 40 mg% de sulfato de protamina. Esta é então usada no lugar da solução de trombina. O controle normal deve ser analisado. Se o tempo de trombina for prolongado, mas corrigido para dentro de dois segundos do resultado do controle, a presença de heparina é confirmada.

Reagentes (Hogwood et al. 2017):

- ✓ Tampão barbitona pH 7,4 (Fritsma, 2019)
- ✓ Estoque de sulfato de protamina – use 5 mL de sulfato de protamina 10 mg/mL para fazer uma diluição de 1/20 usando tampão barbitona. Diluições seriadas de várias concentrações de sulfato de protamina podem ser preparadas a partir desta solução. Elas permanecem estáveis quando armazenadas a 4°C.
- ✓ PPP do paciente
- ✓ Trombina

Método:

- ✓ Dilua em série o sulfato de protamina em tampão barbitona.
- ✓ Prepare a trombina diluída utilizando tampão barbitona. A adição de 100 µL de trombina diluída a 200 µL de plasma do paciente em tampão a 37°C deve permitir a formação de coágulo em 10 segundos.

Interpretação: se o coágulo se formar em até 10 segundos, HNF não está presente no plasma do paciente. Se o tempo for prolongado, HNF está presente no plasma do paciente. O plasma do paciente é misturado com sulfato de protamina diluído e o teste é repetido. O objetivo é medir o tempo de trombina em diferentes diluições de plasma do paciente e sulfato de protamina que permitem a formação de coágulo dentro da faixa normal.

Tempo de Reptilase: reptilase é um veneno de cobra obtido de *Bothrops atrox*. É uma enzima semelhante à trombina, denominada batroxobina, que atua clivando o fibrinogênio para formar fibrinopeptídeo A, levando à formação de um monômero de fibrina e à formação de coágulo por polimerização. Não é inibida por antitrombina, de modo que não é afetada pela presença de heparina ou DTIs. Portanto, pode ser usada para avaliar a taxa de conversão de fibrinogênio em fibrina na presença de heparina e DTIs (Mackie et al, 2024). É útil verificar se o tempo de trombina prolongado é causado pela presença de heparina ou DTIs na amostra. Se o tempo de trombina estiver prolongado e a reptilase estiver normal, a causa mais provável é a presença de heparina ou de um DTI. Na presença de disfibrinogemia, o tempo de reptilase pode ser mais sensível (ou seja, mais prolongado) do que o tempo de trombina. A reptilase adicionada ao plasma do paciente (PPP) fornece batroxobina, que cliva o fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeo A para formar um monômero de fibrina com formação de coágulo após a polimerização (Karapetian, 2013).

Reagentes: reptilase (Sigma Aldrich, código V5375) dissolvida na concentração de 25 mg em 15 mL de tampão de Owren. Esse veneno bruto é perigoso e deve-se tomar cuidado para evitar a inalação do pó. O operador deve usar luvas e máscara ao manusear o veneno bruto. A solução estoque deve ser armazenada congelada a -70°C em alíquotas de 0,5 mL. Permanece estável por pelo menos dois anos nessas condições. Para preparar o reagente pronto para uso, descongele e dilua o reagente estoque a 1/10 em tampão de Owren, divida em alíquotas e congele novamente a -70°C para uso posterior. Esse reagente pronto para uso permanece estável nessas condições por pelo menos três meses. Alíquotas congeladas prontas para uso devem ser descongeladas em banho-maria a 37°C por no mínimo três minutos. Depois disso, essas alíquotas permanecem estáveis para uso por pelo menos 12 horas em temperatura ambiente de 20 a 25°C. Existem diversas preparações de batroxobina disponíveis comercialmente.

Método:

- ✓ Realize todos os testes em duplicata.
- ✓ Coloque tubos de coagulação de vidro de 75 x 10 mm suficientes em banho-maria a 37°C (dois por paciente, mais dois para o controle).
- ✓ Pipete 0,3 mL de plasma (de controle ou paciente) em tubos de coagulação para aquecimento.
- ✓ Aqueça por um a dois minutos.
- ✓ Adicione 0,1 mL de diluição de reptilase e acione o cronômetro.
- ✓ Incline três vezes para misturar e, em seguida, três vezes a cada cinco segundos até a formação do coágulo.
- ✓ Registre o tempo de coagulação.
- ✓ O tempo de controle deve ser de 15 a 18 segundos. (Se for menor, ajuste diluindo mais o reagente de reptilase com tampão de Owren.)
- ✓ Se não ocorrer coagulação, relate como >90 segundos.

Faixa normal: o tempo do paciente deve estar dentro de três segundos do tempo de controle. O tempo de controle deve ser relatado juntamente com o tempo do paciente.

Interpretação: a interpretação do tempo de trombina prolongado e do tempo de reptilase é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Interpretação do tempo de trombina prolongado

Tempo de trombina	Tempo de reptilase	Causa	Observações
Prolongado	Igualmente prolongado	Hipo ou afibrinogenemia	Medir fibrinogênio
Prolongado	Fortemente prolongado	Disfibrinogenemia	Congênita ou adquirida
Prolongado	Normal	Heparina	
Prolongado	Discretamente prolongado	Heparina com alguma hipo ou disfibrinogenemia	Caso raro de disfibrinogenemia pode gerar este padrão
Prolongado	Igualmente prolongado	Coagulação intravascular disseminada (CIVD)	Medir dímeros D
Prolongado	Normal	Inibidores diretos da trombina	

Observação: reagentes de reptilase estão disponíveis em concentração pronta para uso de diversos fabricantes comerciais. A vantagem disso é que não há necessidade de manipular o veneno bruto, evitando assim problemas de saúde e segurança. Caso use um desses, siga as instruções de uso do fabricante. Quando a reptilase for um reagente caro, o método de neutralização com protamina/tempo de trombina pode ser usado para confirmar a presença de heparina na amostra de teste.

Fibrinogênio (Ensaio de Clauss Modificado): diluições de plasma normal padrão com teor conhecido de fibrinogênio são preparadas em tampão glioxalina. O tempo de coagulação é medido após a adição de trombina e um gráfico é construído. O tempo de coagulação é proporcional à concentração de fibrinogênio, e

a diluição de 1/10 representa o valor na preparação padrão. O plasma de teste é diluído 1/10 e o resultado é lido na linha padrão.

Reagentes:

- ✓ Plasma padrão ou de referência com concentração conhecida de fibrinogênio
- ✓ Trombina em alta concentração de 100 – 200 U/mL (a concentração pode variar de acordo com a fonte).
- ✓ Tampão imidazol (glioxalina) ou tampão de Owren pH 7,35

Método: a técnica de inclinação manual do tubo é descrita na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas.

Esse teste não é afetado pela heparina nos níveis utilizados para o tratamento de tromboembolismo venoso. Supõe-se que o uso de uma concentração mais alta de trombina anule o efeito de altas concentrações de HNF sobre a trombina, como as aplicadas na circulação extracorpórea, permitindo a formação de coágulo. No entanto, deve-se ter cautela ao interpretar os resultados desses pacientes, uma vez que podem ser observados tempos de coagulação prolongados, levando a subestimação do fibrinogênio, a menos que o reagente contenha neutralizadores de heparina para anular isso. O efeito dos DTIs dependerá altamente da concentração do DTI no plasma do paciente e do tipo de reagente utilizado. Os DTIs na faixa terapêutica não afetam a trombina em alta concentração usada no ensaio de fibrinogênio de Clauss (Mackie et al, 2024).

Dados de calibração típicos:

(Observação: uma curva de calibração deve ser estabelecida com os reagentes em uso local.)

Plasma padrão: 2,1 g/L de fibrinogênio

Tabela 11. Exemplo de calibração de fibrinogênio

Diluição do padrão	Concentração de fibrinogênio (g/L)	Tempo de coagulação (segundos)
1/5	4,2	8,5
1/10	2,1	14
1/15	1,4	19,5
1/20	1,05	24,5

Exemplos:

Plasma de teste 1: diluído 1:10, tempo de coagulação de 15 segundos.

fibrinogênio = 1,9 g/L (do gráfico de calibração)

Plasma de teste 2: diluído 1:5, tempo de coagulação de 16 segundos.

fibrinogênio = 1,8 g/L do gráfico de calibração x 5/10 (desde a diluição de 1/5 em vez de 1/10)

= 0,9 g/L

Observações sobre o ensaio de fibrinogênio de Clauss: o nível de fibrinogênio pode ser subestimado na presença de altas concentrações de produtos de degradação de fibrina/fibrinogênio; portanto, recomenda-se interpretação cuidadosa dos resultados quando houver suspeita disso. A coleta de amostras de sangue para coagulação de dispositivos venosos ou arteriais contaminados com heparina deve ser evitada para excluir a possibilidade de interferência obscura da heparina nos resultados obtidos. Amostras de pacientes que recebem altas doses de HNF devem ser evitadas ao quantificar os níveis de fibrinogênio para evitar a obtenção de resultados falsamente baixos.

Teste de Fibrinogênio Derivado de TP: diversos analisadores de coagulação podem estimar o nível de fibrinogênio durante a determinação do tempo de protrombina. Isso é possível porque a alteração na dispersão ou transmissão da luz causada pela formação do coágulo é proporcional à concentração inicial de fibrinogênio. Esses métodos são comumente chamados de fibrinogênio derivado de TP. A maioria dos métodos derivados de TP apresenta limitações. Em particular, os resultados obtidos são frequentemente muito mais altos do que os obtidos pelo ensaio de Clauss quando há níveis muito baixos (<1,5 g/L) ou elevados (acima de 5 g/L) de fibrinogênio. Os resultados geralmente ficam acima do normal na presença de disfibrinogenemia (Mackie et al, 2024; Miesbach et al, 2010). Existem métodos de fibrinogênio de Clauss adequados para análise de plasma de teste não diluído, mas os resultados podem não ser intercambiáveis com os resultados dos ensaios de Clauss amplamente utilizados que empregam plasma de teste diluído (Jennings et al, 2009).

Fatores que afetam o uso de fibrinogênio derivado de TP: para pacientes em terapia anticoagulante, é aconselhável não utilizar a estimativa de fibrinogênio derivado de TP para quantificar seus níveis de fibrinogênio. Certos anticoagulantes orais afetam a geração de trombina, acabando por reduzir a produção de trombina e causando a formação de fibrilas espessas que são detectadas como turbidez na amostra pelos sensores ópticos e retransmitidas como aumento de fibrinogênio (Chitolie et al, 1994). Houve casos de pacientes com hipodisfibrinogenemia que foram identificados como tendo fibrinogênio derivado de TP normal, enquanto esses níveis eram, na verdade, baixos quando medidos pelo método de Clauss (Chitolie et al, 1994). A turbidez do plasma de referência ocasiona estimativas mais altas dos níveis de fibrinogênio. Além disso, o plasma lipêmico e turvo de paciente pode levar a estimativas errôneas e elevadas de fibrinogênio. Esses níveis inexatos de fibrinogênio podem ser observados em pacientes com doenças crônicas e graves. Com base nas diretrizes internacionais vigentes sobre quantificação de fibrinogênio, recomenda-se o método de fibrinogênio de Clauss e, em razão das inexatidões associadas ao fibrinogênio derivado de TP, não deve ser usado para triagem de deficiências de fibrinogênio nem em pacientes sabidamente em terapia anticoagulante, e os resultados devem ser interpretados com cautela.

Remoção de Heparina do Plasma: a heparinase 1 (componente ativo do Hepzyme®) é específica para a heparina, que cliva em múltiplos sítios por molécula, produzindo oligossacarídeos que perderam sua atividade antitrombótica. Hepzyme® é uma heparinase 1 bacteriana purificada, produzida por *Flavobacterium heparinum*. Consegue remover até 2 UI de heparina por mL de plasma. Hepzyme® pode ser usado para neutralizar o efeito da heparina em uma amostra, permitindo a avaliação do status de coagulação subjacente. É particularmente utilizado em casos de contaminação por heparina (Forte e Abshire, 2000).

Reagentes:

- ✓ Hepzyme®, frasco contendo preparação seca de heparinase 1 com estabilizantes
- ✓ Fabricante: Dade Behring
- ✓ Armazenamento: 4°C
- ✓ Estabilidade: de acordo com a data de validade do fabricante. Cada frasco é usado apenas para teste de um paciente

Método:

- ✓ Adicione 1,0 mL de plasma citratado pobre em plaquetas a um frasco de Hepzyme®.
- ✓ Feche novamente e inverta suavemente de 5 a 10 vezes.
- ✓ Deixe em temperatura ambiente por 15 minutos.
- ✓ Transfira para um copo de amostra de plástico de 2 mL e aguarde alguns instantes para que as bolhas desapareçam.
- ✓ Coloque no CA1500 e realize o teste necessário.

O tempo de trombina deve ser incluído para verificar se toda a heparina foi removida com sucesso. Os testes devem ser realizados o mais breve possível (ou seja, dentro das diretrizes de teste para esse procedimento).

Interpretação: essa enzima não remove nenhum fator de coagulação (ao contrário de algumas das técnicas alternativas para remoção de heparina), portanto, uma redução substancial dos tempos de coagulação no TTPA, tempo de trombina ou TP após o tratamento com hepzyme indica a presença de heparina. As formas de HNF e de baixo peso molecular são degradadas por essa enzima.

Referências

- Adcock DM, Gosselin RC. The danger of relying on the APTT and PT in patients on DOAC therapy, a potential patient safety issue. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 37-40.
- Adcock DM, Moore GW, Montalvão SL, Kershaw G, Gosselin RC. Activated partial thromboplastin time and prothrombin time mixing studies: Current state of the art. *Semin Thromb Hemost* 2023; 49(6): 571-579.
- Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: Implications for decentralized anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haematol* 1997; 96(3): 431-434.
- Bonar RA, Lippi G, Favaloro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. In: Favaloro EJ, Lippi G, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2017: 3-27.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inaccuracy of the 'derived' fibrinogen measurement. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5(6): 955-957.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test, 3rd edition. CLSI standard H47. 2023. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h47>.
- Dorgalaleh A, Favaloro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol* 2021; 43(1): 21-28.
- Favaloro EJ. Coagulation mixing studies: Utility, algorithmic strategies and limitations for lupus anticoagulant testing or follow up of abnormal coagulation tests. *Am J Hematol* 2020; 95(1): 117-128.
- Favaloro EJ. Optimizing the verification of mean normal prothrombin time (MNPT) and international sensitivity index (ISI) for accurate conversion of prothrombin time (PT) to international normalized ratio (INR). *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 59-74.
- Forte K, Abshire T. The use of heparinase in removing heparin from blood samples drawn from central venous access devices. *J Pediatr Oncol Nurs* 2000; 17(3): 179-181.
- Fritsma GA. Antithrombotic Therapies and Their Laboratory Assessment. In: *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. 2019: 746-764.
- Hogwood J, Mulloy B, Gray E. Precipitation and neutralization of heparin from different sources by protamine sulfate. *Pharmaceuticals (Basel)* 2017; 10(3): 59.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 15189:2022(en) Medical laboratories — Requirements for quality and competence. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:en>. Accessed March 23, 2025.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods T, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: Data from UK National External Quality Assessment Scheme surveys. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20(5): 388-390.
- Karapetian H. Reptilase time (RT). *Methods Mol Biol* 2013; 992: 273-277.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of seven APTT reagents in relation to heparin sensitivity. *Br J Haematol* 1999; 106(3): 801-808.
- Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68(3): 301-305.
- Lowe A, Kitchen S, Jennings I, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Effects of emicizumab on APTT, FVIII assays and FVIII inhibitor assays using different reagents: Results of a UK NEQAS proficiency testing exercise. *Haemophilia* 2020; 26(6): 1087-1091.

Mackie I, Casini A, Pieters M, Pruthi R, Reilly-Stitt C, Suzuki A. International Council for Standardisation in Haematology recommendations on fibrinogen assays, thrombin clotting time and related tests in the investigation of bleeding disorders. *Int J Lab Hematol* 2024; 46(1): 20-32.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121(3): 396-404.

Maier CL, Sniecinski RM. Anticoagulation monitoring for perioperative physicians. *Anesthesiology* 2021; 135(4): 738-748.

Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52(2): 210-211.

Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thromb Res* 2010; 126(6): e428-433.

Miller CH. Laboratory testing for factor VIII and IX inhibitors in haemophilia: A review. *Haemophilia* 2018; 24(2): 186-197.

Pipe SW. Functional roles of the factor VIII b domain. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1187-1196.

Practical-Haemostasis.com. Protamine sulphate neutralization test. <https://practical-haemostasis.com/>. Accessed March 23, 2025.

Rodgers RPC, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 499-516.

Russeau AP, Vall H, Manna B. Bleeding Time. [Updated 2023 Aug 8]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK537233/>. Accessed March 23, 2025.

Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, Appert-Flory A. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 389-396.

Undas A. The bleeding time test in 2024: A glorious past and current challenges. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 517-519.

Vandiver JW, Vondracek TG. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin. *Pharmacotherapy* 2012; 32(6): 546-558.

Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1808-1817.

Williams B, Lin Z, Pittet JF, Chao W. Sepsis-induced coagulopathy: a comprehensive narrative review of pathophysiology, clinical presentation, diagnosis, and management strategies. *Anesth Analg* 2024; 138(4): 696-711.

TÓPICOS ABORDADOS

- | | |
|--|--|
| ✓ Ensaio dos Fatores VIII e IX: Métodos | ✓ Monitoramento Pós-Infusão de FVIII e FIX |
| ✓ de Um Estágio e Cromogênico | ✓ Terapia Gênica |
| ✓ Realização de Ensaios de Fatores em Analisadores | ✓ Aspectos Laboratoriais para Tratamento com Terapia |
| Cujo Software Utiliza Diluição Única | de Reequilíbrio da Hemostasia |
| ✓ Anticorpos Biespecíficos | |
-

Ensaio dos Fatores VIII e IX: Métodos de Um Estágio e Cromogênico: o diagnóstico laboratorial de hemofilia A ou B é feito pela medição da atividade do fator (Srivastava et al, 2020). A metodologia mais comumente usada é o ensaio de coagulação de um estágio baseado no TTPA. O ensaio de um estágio para atividade do FVIII é descrito nesta seção. O ensaio se baseia na comparação da capacidade de diluições de plasmas padrão e de teste para corrigir o TTPA de plasma totalmente deficiente em FVIII, mas que contém todos os outros fatores necessários para a coagulação normal. Para os fatores IX, XI e XII, o ensaio é essencialmente igual e é realizado pela substituição do plasma deficiente relevante por plasma deficiente em FVIII e após a seleção do plasma de referência apropriado (Baker et al, 2020). O ensaio de FVIII ou FIX de um estágio não pode ser realizado na presença de anticorpos biespecíficos, como emicizumabe (Jenkins et al, 2020).

Reagentes:

- ✓ Plasma de teste citratado pobre em plaquetas
- ✓ Plasma padrão (de referência/calibrador)

O plasma padrão (de referência) utilizado deve ser um pool de plasma preparado localmente e mantido a -70°C ou menos, ou plasma padrão comercial. Em ambos os casos, esse plasma de referência deve ser calibrado para o ensaio de coagulação de acordo com o padrão internacional vigente para FVIII ou FIX no plasma. Não é aceitável presumir que um pool de plasma normal tenha 100 UI/dL.

- ✓ Plasma de controle de qualidade interno (CLSI, 2016)
- ✓ Plasma deficiente em FVIII

Esse plasma está disponível comercialmente ou pode ser coletado de um doador com hemofilia nas seguintes condições:

- ✓ Nível menor que 1 UI/dL
- ✓ Sem histórico de anticorpos contra FVIII
- ✓ Não recebeu tratamento por duas semanas, incluindo terapia de meia-vida estendida (EHL) ou terapia com anticorpos biespecíficos
- ✓ Testes de função hepática normais

Função hepática anormal pode levar à redução de outros fatores de coagulação, o que afeta a especificidade do ensaio. Esse plasma pode ser armazenado em alíquotas a -20°C ou menos por aproximadamente 1 mês (Woodhams et al, 2001; Zhao et al, 2018). É preferível utilizar plasma deficiente em FVIII/FIX produzido por imunodepleção de FVIII ou FIX de plasma normal usando um anticorpo monoclonal. Esse tipo de material está disponível comercialmente e tem a vantagem de maior segurança viral em comparação com o plasma proveniente de pacientes com hemofilia tratados com produtos derivados de plasma. Entretanto, nem todos os

plasmas imunodepletados são <1 UI/dL, e deve-se ter cuidado ao verificar isso antes do uso. Alguns especialistas consideram que a presença de concentrações normais de FVW no plasma deficiente em FVIII/FIX pode ser uma vantagem, e há evidências que corroboram essa afirmação em relação aos ensaios realizados como parte das determinações de inibidores (Verbruggen et al, 2001).

- ✓ Reagente de TTPA sensível a deficiências de fatores (CLSI, 2016)
- ✓ Solução salina tamponada de Owren (OBS ou tampão glioalinala; consulte a seção sobre reagentes)
- ✓ CaCl_2 25 mM (observe que o CaCl_2 da Werfen fornecido com SynthASil é 20 mM)

Método:

- ✓ Faça diluições de 1/10 de plasma padrão, de CQ e teste em solução salina tamponada em tubos plásticos (se for esperado que o plasma de teste tenha um nível muito baixo de FVIII, comece com diluição de 1/5.)
- ✓ Usando volumes de 0,2 mL, faça diluições duplas em OBS de plasma padrão, de CQ e teste de 1/10 a 1/40 em tubos plásticos (misture bem cada diluição antes de transferir para o próximo tubo). As diluições de plasma devem ser testadas imediatamente após a preparação. Se a temperatura ambiente exceder 25°C, pode ser necessário manter as diluições em gelo úmido antes do teste.
- ✓ Pipete 0,1 mL de cada diluição padrão para um tubo de vidro de 75 x 10 mm.
- ✓ Adicione 0,1 mL de plasma deficiente em FVIII e transfira para banho-maria a 37°C.
- ✓ Adicione 0,1 mL de reagente de TTPA e incube por 5 minutos.
- ✓ Aos 5 minutos, adicione 0,1 mL de CaCl_2 e registre o tempo de coagulação.
- ✓ Um “branco” também deve ser preparado utilizando 0,1 mL de OBS em vez de plasma de teste.

O tempo de coagulação do branco deve ser maior que o tempo de atividade de FVIII de 1% do padrão no gráfico de calibração. Se o tempo for menor, isso indica que o plasma substrato não é totalmente deficiente em FVIII e, portanto, não é um plasma substrato adequado.

Resultados: a representação gráfica dos resultados requer papel milimetrado com escala logarítmica dupla ou logarítmica/linear. A diluição de 1/10 recebe arbitrariamente o valor de 100%, a diluição de 1/20, o valor de 50%, e a diluição de 1/40, o valor de 25%. Se utilizada, a diluição de 1/5 tem o valor de 200%. Linhas retas, paralelas entre si, devem ser obtidas. Leia a concentração da amostra de teste conforme mostrado na Figura 7. Nesse exemplo, a concentração de FVIII na amostra de teste é 7% daquela no padrão. Se o padrão tiver concentração de FVIII de 85 UI/dL, a amostra de teste terá concentração de $85 \text{ UI/dL} \times 7\% = 6 \text{ UI/dL}$. Se as linhas não forem paralelas, o ensaio deve ser repetido. Linhas não paralelas podem ocorrer devido a erros técnicos. Se o erro técnico tiver sido eliminado, pode ser devido à presença de um inibidor, que pode agir especificamente contra o FVIII, ou pode ser do tipo “lúpico”, apresentando padrão convergente. Linhas divergentes são típicas de uma amostra ativada ou da presença de um DOAC (Baker et al, 2020).

Observações: se a concentração de FVIII (ou FIX) no plasma de teste for próxima de zero (ou seja, se os tempos de coagulação de todas as diluições forem semelhantes aos do branco), podem ocorrer linhas não paralelas. A presença de anticoagulante lúpico pode interferir nos fosfolípidios dos reagentes de TTPA e produzir ensaios de fatores não paralelos (Ruinemans-Koerts et al, 2001). A faixa normal deve ser estabelecida localmente, mas com frequência apresenta limite inferior de 50 a 65 UI/dL para FVIII e FIX. O monitoramento exato de alguns produtos de EHL por ensaio de um estágio pode ser afetado pelo reagente de TTPA utilizado (Gray et al, 2020). Consulte a Parte 6 sobre EHL. Ensaios de FVIII ou FIX de um estágio não podem ser realizados na presença de anticorpos biespecíficos, como emicizumabe. Esses medicamentos encurtam artificialmente o TTPA. O tempo de coagulação curto em um ensaio de um estágio corresponde a alta atividade do fator (Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). Consulte a Parte 6 sobre anticorpos biespecíficos. Discrepância no FVIII entre ensaio de um estágio e cromogênico foi descrita na hemofilia A leve em algumas áreas geográficas e raramente na hemofilia B leve (Pouplard et al, 2009). Se possível, um novo diagnóstico de hemofilia leve deve incluir FVIII:C ou FIX:C também medidos por ensaio cromogênico (Bowyer et al., 2018). Ensaios de FVIII de um estágio podem ser usados para medir a terapia com FVIII recombinante suíno (Bowyer et al., 2022). Há uma mutação no FIX, FIX Padua (p.R338L), que apresenta atividade de FIX oito vezes maior que a do antígeno (Simioni et al, 2009).

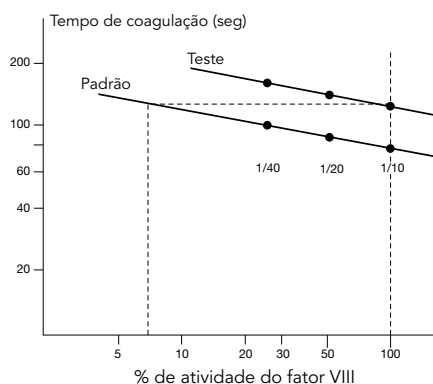


Figura 7. Gráfico do ensaio de FVIII

As amostras de teste devem ser analisadas utilizando três diluições diferentes da amostra, conforme descrito acima. Essa é uma recomendação consistente em diretrizes nacionais e internacionais publicadas, incluindo as da WFH. Ela melhora a exatidão e a precisão do ensaio em comparação com o uso de uma única diluição da amostra de teste. Às vezes, os ensaios de fatores são realizados em analisadores com software projetado para testar apenas uma única diluição da amostra de teste. A seção a seguir descreve um método que pode ser usado para incluir três diluições da amostra de teste nesses analisadores.

Realização de Ensaios de Fatores em Analisadores cujo Software Utiliza Diluição Única da Amostra de Teste:

a WFH recomenda que ensaios baseados em TTPA de um estágio para FVIII e FIX sejam realizados utilizando três diluições diferentes da amostra de teste. Isso é descrito no seguinte documento:

Diretrizes da WFH para Manejo da Hemofilia, 3ª edição. Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW, Carcao M, Mahlangu J, Ragni MV, Windyga J, Llinás A, Goddard NJ, Mohan R, Poonnoose PM, Feldman BM, Lewis SZ, van den Berg HM, Pierce GF; Capítulo 3: Diagnóstico e Monitoramento Laboratorial. Steve Kitchen, Francisco de Paula Careta, Silmara A de Lima Montalvão, Emna Gouider, Radoslaw Kaczmarek, Claude T. Tagny, Pierre Toulon, Glenn F. Pierce, Alok Srivastava. Haemofilia 2020; 26 (Supl 1): 35-48.

O documento completo está disponível para download gratuito no site da WFH por meio do seguinte link:

[Guidelines for the Management of Hemophilia – Plataforma de eLearning \(wfh.org\)](https://www.wfh.org/publications-and-documents/guidelines-for-the-management-of-hemophilia-plataforma-de-elearning)

O texto a seguir foi reproduzido da diretriz da WFH:

Recomendação: Para a investigação laboratorial decorrente de uma suspeita clínica de hemofilia usando ensaios de FVIII/FIX de um estágio, a WFH recomenda a análise usando três diluições diferentes das amostras de plasma de referência e de teste.

OBSERVAÇÃO: Os resultados das diluições de plasma de teste e padrão devem ser comparados por análise em linha paralela. Um modo para realizar essa avaliação consiste em calcular o coeficiente de variação (CV) dos três resultados usando a equação $CV = \left(\frac{\text{desvio padrão}}{\text{média}} \times 100 \right)$. Se o CV dos três resultados for menor que 15%, então a média dos três resultados deve ser relatada. Se o CV for maior que 15%, os resultados devem ser examinados com atenção. A presença de inibidores patológicos contra fatores de coagulação específicos ou anticoagulantes lúpicos pode interferir em alguns ensaios de FVIII e FIX de um estágio. Alguns anticoagulantes terapêuticos também podem exibir esse efeito de interferência. Em todos esses contextos, a atividade do fator aumenta no ensaio conforme o plasma é progressivamente diluído. A atividade do fator é subestimada quando o plasma é menos diluído e um resultado de atividade mais exato é obtido quando o plasma de teste é mais diluído.

Os princípios acima também devem ser aplicados a ensaios de um estágio para outros fatores de coagulação (ou seja, FII, FV, FVII, FX, FXI e FXII). Alguns analisadores possuem software que permite mais de uma diluição da amostra de teste. Nesses analisadores, a amostra de teste é apresentada para análise e o analisador constrói as diferentes diluições, executa o ensaio e calcula a atividade do fator de coagulação a ser analisado. Outros analisadores possuem software que permite apenas uma única diluição da amostra de teste. O procedimento abaixo pode ser usado nesses analisadores para que as recomendações da WFH possam ser seguidas com maior exatidão e precisão do ensaio.

Os exemplos fornecidos são para ensaios de FVIII, mas podem ser usados para ensaios de um estágio de outros fatores.

- ✓ As amostras de teste são colocadas no analisador não diluídas (ou seja, sem qualquer pré-diluição pelo operador).
- ✓ A amostra de teste é pré-diluída na proporção de 1:2 pelo operador com o mesmo tampão de ensaio utilizado pelo analisador, que geralmente é o tampão de Owren, mas pode ser um tampão diferente.
- ✓ Isso pode ser feito em tubos ou frascos de plástico que possam ser apresentados ao analisador para análise e que não causem ativação da amostra de teste.
- ✓ A amostra de teste é pré-diluída na proporção de 1:4 com o mesmo tampão de ensaio utilizado pelo analisador (vide pontos 2 e 3 acima).
- ✓ Isso significa que o analisador recebe três materiais diferentes derivados da mesma amostra de teste.
- ✓ O analisador é então solicitado a executar um ensaio de FVIII em cada um desses três materiais (ou seja, amostra de teste não diluída, amostra de teste pré-diluída 1:2 e amostra de teste pré-diluída 1:4).
- ✓ Um resultado de FVIII é obtido na amostra de teste não diluída.
- ✓ Outro resultado é obtido na amostra de teste que foi pré-diluída 1:2. Esse deve ser multiplicado por 2 para corrigir a pré-diluição.
- ✓ Outro resultado é obtido na amostra de teste que foi pré-diluída 1:4. Esse deve ser multiplicado por 4 para corrigir a pré-diluição.
- ✓ Os três números são então comparados pelo operador.
- ✓ Normalmente, os três números são muito próximos. Nesse caso, o operador consegue calcular e relatar a média dos três números como a atividade de FVIII da amostra de teste.
- ✓ Às vezes, os três números não são próximos. Isso pode ocorrer se a amostra contiver substâncias interferentes ou se a coagulação tiver sido ativada na amostra (por exemplo, talvez devido a dificuldades durante a coleta da amostra).
- ✓ O operador deve decidir se é seguro usar a média das três respostas diferentes.
- ✓ A WFH recomenda o uso de uma avaliação matemática simples para decidir.
- ✓ Isso é feito calculando o CV dos três resultados diferentes.
- ✓ A média dos três resultados diferentes pode ser usada com segurança se o CV for <15%.
- ✓ O uso da média dessa maneira melhora a precisão do teste.
- ✓ Se o CV for maior que 15%, o operador terá mais decisões a considerar.
- ✓ Quando o nível do fator for 10 a 15 UI/dL, o CV das três diluições é maior do que quando a atividade do fator está em níveis mais altos. Nessas amostras, um CV de 20% pode ser aceito.
- ✓ Quando o nível do fator estiver abaixo de 5 UI/dL, pré-diluição de 1:4 pode reduzir a atividade do fator abaixo do limite inferior de quantificação, dependendo dos reagentes. Nessas amostras, é aceitável testar apenas a amostra de teste não diluída e a amostra de teste pré-diluída 1:2. Nesse caso, o laboratório deve relatar a média dos dois resultados (após multiplicar o resultado do analisador da diluição 1:2 por 2), sem cálculo do CV.
- ✓ Para amostras com FVIII >15 UI/dL, se o CV for >15% e o resultado no plasma não diluído for menor que os resultados na terceira diluição, isso indica que pode haver uma substância interferente na amostra de teste. Nesse caso, o resultado obtido para a diluição 1:4 (após multiplicação do resultado do analisador por 4 para corrigir a pré-diluição) será o mais exato (veja os exemplos abaixo).
- ✓ Exemplos de substâncias interferentes que podem causar esse resultado falsamente baixo nas amostras de teste não diluídas são inibidores como anticoagulante lúpico, HNF, DTIs ou inibidores diretos de FXa.
- ✓ O uso de uma única diluição pode levar a resultados falsamente baixos e ensaios extremamente inexatos.

Alguns exemplos são apresentados abaixo.

Tabela 12. Exemplo 1 - Ensaio de FVIII com pré-diluição manual

	Atividade do FVIII registrada pelo analisador	Atividade do FVIII após correção da pré-diluição	Comentários
Amostras de teste sem pré-diluição	25 UI/dL (%)	25 UI/dL (%)	Nenhuma pré-diluição pelo operador, portanto o resultado não muda
Amostras de teste diluídas 1:2 antes da análise	13,5 UI/dL (%)	27 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 2
Amostras de teste diluídas 1:4 antes da análise	6 UI/dL	24 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 4

- ✓ A média dos três resultados é 25,3 UI/dL (%).
- ✓ O desvio padrão dos três resultados é 1,53.
- ✓ O CV dos três resultados é 6,0%.
- ✓ O CV é <15%, portanto o resultado relatado é **25,3 UI/dL (%)**.

Tabela 13. Exemplo 2 - Ensaio de FVIII com pré-diluição manual

	Atividade do FVIII registrada pelo analisador	Atividade do FVIII após correção da pré-diluição	Comentários
Amostras de teste sem pré-diluição	62 UI/dL (%)	62 UI/dL (%)	Nenhuma pré-diluição pelo operador, portanto o resultado não muda
Amostras de teste diluídas 1:2 antes da análise	33 UI/dL (%)	66 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 2
Amostras de teste diluídas 1:4 antes da análise	13 UI/dL	52 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 4

- ✓ A média dos três resultados é 60,0 UI/dL (%).
- ✓ O desvio padrão dos três resultados é 7,2.
- ✓ O CV dos três resultados é 12,0%.
- ✓ O CV é <15%.
- ✓ O resultado relatado é **60,0 UI/dL (%)**.

Tabela 14. Exemplo 3 - Ensaio de FVIII com pré-diluição manual

	Atividade do FVIII registrada pelo analisador	Atividade do FVIII após correção da pré-diluição	Comentários
Amostras de teste sem pré-diluição	7,0 UI/dL (%)	7,0 UI/dL (%)	Nenhuma pré-diluição pelo operador, portanto o resultado não muda
Amostras de teste diluídas 1:2 antes da análise	3,0 UI/dL (%)	6,0 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 2
Amostras de teste diluídas 1:4 antes da análise	2,1 UI/dL	8,4 UI/dL (%)	Resultado do analisador multiplicado por 4

- ✓ A média dos três resultados é 7,1 UI/dL (%).
- ✓ O desvio padrão dos três resultados é 7,1.
- ✓ O CV dos três resultados é 16,9%.
- ✓ O CV é <20%.
- ✓ O resultado relatado é **7,1 UI/dL (%)**.

Tabela 15. Exemplos com substâncias interferentes presentes, os resultados do ensaio de FVIII estão em UI/dL (%)

Interferência	Sem pré-diluição	Pré-diluída 1:2		Pré-diluída 1:4		Resultados usados para calcular o CV	CV
		Resultado do analisador	Resultado corrigido pelo operador	Resultado do analisador	Resultado corrigido pelo operador		
Inibidor direto da trombina	46,5	34,0	68,0	18,5	74,0	46,5, 68,0, 74,0	23,0%
Rivaroxabana	64,0	45,2	90,4	29,1	116,4	64,0, 90,4, 116,4	29,0%
Anticoagulante lúpico	25,3	19,3	38,6	16,2	64,8	25,3, 38,6, 64,8	46,8%

- ✓ Observe que padrões semelhantes ocorrem em outros ensaios de um estágio, como de FIX.
- ✓ Todos os três apresentam CVs >15%.
- ✓ Os efeitos dessas substâncias interferentes são geralmente menores na amostra com diluição de 1:4 do que na amostra não diluída ou na amostra com pré-diluição de 1:2.
- ✓ O resultado da amostra de 1:4 ainda pode ser uma subestimação, mas é o mais próximo de um resultado exato dos três testes realizados. Também pode ser útil adicionar pré-diluição de 1:8 como um quarto teste nesses casos.
- ✓ Os resultados relatáveis dos exemplos na tabela podem ser >74 UI/dL (%), >116,4 UI/dL (%) ou >64,8 UI/dL (%).

Todas as três amostras de teste neste exemplo apresentam atividade de FVIII que não está reduzida abaixo da faixa normal. A confirmação de que a atividade não está reduzida às vezes é suficiente para o manejo seguro do paciente.

Ensaios cromogênicos de FVIII:C e FIX: o diagnóstico laboratorial de hemofilia A ou B é feito pela medição da atividade do fator (Srivastava et al, 2020). A metodologia mais comumente utilizada é o ensaio de coagulação de um estágio baseado no TTPA (OSA). Há limitações no ensaio de estágio, inclusive interferência se anticoagulantes lúpicos, anticoagulantes orais diretos (DOACs) ou terapias de meia-vida prolongada para hemofilia, incluindo anticorpos biespecíficos, estiverem presentes (Gray et al, 2020; Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2021; Moser et al, 2021; Ruinmans-Koerts et al, 2010). Mais importante ainda, hemofilia A leve não é excluída pelo achado de nível normal de FVIII:C, e raramente de FIX:C, no OSA (Pouplard et al, 2009). Vários grupos relataram que um subgrupo de pacientes com hemofilia A leve apresenta discrepância entre a atividade do FVIII determinada por meio de diferentes tipos de ensaios (Pavlova et al, 2014). Mais de 20% dos pacientes com hemofilia A leve estão associados a discrepância na qual a atividade cromogênica é duas vezes ou menor que a do OSA e o fenótipo de sangramento é compatível com o ensaio de substrato cromogênico (CSA) (Bowyer et al, 2018). Uma forma reversa de discrepância de ensaios também pode ocorrer com FVIII:C duas ou mais vezes menor pelo OSA do que pelo CSA. Relatos de sangramento são muito menores nesses pacientes (Bowyer et al, 2018; Bowyer et al, 2011). Exemplos de resultados nesses pacientes são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Exemplos de pacientes com hemofilia A leve confirmada geneticamente e discrepâncias de ensaios

Caso	Ensaio de um estágio (UI/dL)	Ensaio cromogênico (UI/dL)
A	101	13
B	88	28
C	15	69
D	55	40
E	58	33
F	72	36
G	84	45

Com base nesses resultados, é vantajoso que todos os centros de hemofilia tenham um ensaio cromogênico de FVIII disponível. CSA deve ser realizado em indivíduos com TTPA normal e atividade de FVIII em um estágio, na presença de histórico pessoal ou familiar consistente com hemofilia leve. Os CSAs de FVIII foram introduzidos pela primeira vez no início da década de 1980 (Rosen et al, 1984) e vários fabricantes possuem kits comerciais para ensaio cromogênico de FVIII. Muitos deles são adequados para o diagnóstico de hemofilia A na presença de atividade normal de FVIII em um estágio. Um pequeno número de CSAs de FIX está disponível desde meados da década de 2010 e, em sua maioria, limita-se a laboratórios de pesquisa ou de hemostasia especializados (Kershaw et al, 2018). Discrepância no FIX entre ensaio de um estágio e cromogênico foi descrita na hemofilia B leve, mas a discrepância parece comprometer a classificação da gravidade, com os pacientes alternando entre hemofilia B moderada e leve (Pouplard et al, 2009; Truedsson et al, 2020).

Princípio de análise para CSA de FVIII: muitos coagulômetros automatizados têm a capacidade de realizar CSA, mas como esses ensaios eram originalmente realizados de forma manual usando placas de microtitulação, ainda é possível usar um método manual. Em alguns (mas não todos) ensaios cromogênicos, todo o FVIII na amostra é ativado pela trombina. O FVIII ativado então acelera a conversão de FX em FXa na presença de FIX ativado, fosfolipídios e íons de cálcio. A atividade de FXa é avaliada pela hidrólise de um substrato p-nitroanilina específico para FXa. A taxa inicial de liberação de p-nitroanilina (cor amarela) medida a 405 nm é proporcional à atividade do FXa e, por conseguinte, à atividade do FVIII na amostra. Os resultados do plasma do paciente e da amostra de controle de qualidade são comparados com o plasma padrão (de referência/calibrador) para quantificar o CSA utilizando os mesmos princípios do OSA (Baker et al, 2020). As proteínas usadas nos kits de CSA de FVIII podem ser de origem humana ou bovina. Para medição de FVIII:C endógeno ou terapia com FVIII de meia-vida estendida ou padrão, a fonte de proteínas não afeta o CSA. A fonte de proteínas é importante quando anticorpos biespecíficos estão presentes no plasma (consulte a seção Parte 6 sobre anticorpos biespecíficos).

Princípio de análise para CSA de FIX: em alguns (mas não todos) ensaios cromogênicos de FIX, todo o FIX na amostra é ativado por FXIa. O FIX ativado então acelera a conversão de FX em FXa na presença de FVIII ativado, fosfolipídios e íons de cálcio. A atividade de FXa é avaliada pela hidrólise de um substrato de p-nitroanilina específico para FXa. A taxa inicial de liberação de p-nitroanilina (cor amarela) medida a 405 nm é proporcional à atividade do FXa e, por conseguinte, à atividade do FIX na amostra, conforme descrito acima.

Observações: se a concentração de FVIII (ou FIX) no plasma de teste for próxima de zero (ou seja, se a densidade óptica de todas as diluições for semelhante à do branco), podem ocorrer linhas não paralelas. A faixa normal deve ser estabelecida localmente, mas com frequência apresenta limite inferior de 50–65 UI/dL para FVIII e FIX. O CSA de FIX pode não medir com exatidão a recuperação de alguns produtos de FIX de meia-vida estendida (Gray et al, 2020; Bowyer et al, 2022). Ensaios cromogênicos podem ser usados para medir o efeito mimético em plasma que contém anticorpos biespecíficos (Jenkins et al, 2020; Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). CSA de FVIII contendo FX bovino pode ser usado para medir a terapia com FVIII recombinante em plasma que também contém anticorpos biespecíficos. Se possível, um novo diagnóstico de hemofilia A ou B leve deve ter FVIII:C ou FIX:C também medidos por ensaio cromogênico (Bowyer et al, 2018). Deve-se ter cautela ao usar o CSA para medir o FVIII suíno recombinante, pois pode ocorrer subestimação (Bowyer et al, 2022). O CSA de FIX pode subestimar as terapias com FIX de meia-vida padrão recombinante (Nederlof et al, 2020).

Medição das moléculas de FVIII e FIX de EHL: foram feitas modificações no FVIII ou FIX recombinante para estender a meia-vida *in vivo* da terapia, alterando a conformação da molécula. A extensão pode ser feita pela adição de grupos de polietilenoglicol (PEG), ligação covalente das cadeias pesada e leve do FVIII, fusão à albumina ou fusão covalente à porção fc (fragmento cristalizável) da IgG1 humana. Monitoramento pós-infusão dos concentrados de FVIII ou FIX de EHL recombinante é necessário para o manejo clínico do paciente com hemofilia. Resposta menor do que a esperada ou meia-vida reduzida pode indicar a necessidade de terapia adicional ou possível desenvolvimento de anticorpos antidroga. Estudos laboratoriais conduzidos durante os ensaios farmacêuticos de cada EHL destacaram problemas com a medição laboratorial exata de algumas moléculas. Super ou subestimação foi relatada com alguns FVIII ou FIX de EHL, mas isso dependeu da metodologia ou do TTPA utilizado no OSA. O método de modificação molecular não é preditivo da resposta do ensaio de fator, de modo que o monitoramento exato das três moléculas de FVIII PEGilado pode não ser possível com os mesmos reagentes de TTPA. Para moléculas de FVIII de EHL atualmente licenciadas, todos os ensaios cromogênicos de atividade de FVIII são

considerados adequados para monitoramento exato, mas no caso de OSA, isso pode depender do reagente. Para moléculas de FIX de EHL, não existe uma única metodologia ou reagente de ensaio que meça com exatidão todos os três concentrados atualmente licenciados. Um concentrado de meia-vida ultralonga, rFVIII-FCVWF-XTEN, efanosoctocog alfa (Altuviiio/Altuvioct), recebeu aprovação regulatória nos EUA em 2023 e na Europa em 2024. Recomenda-se monitoramento por OSA de FVIII usando um reagente de TTPA específico, Actin FSL da Siemens. Os reagentes de TTPA prevalentes, Actin FS da Siemens e Synthasil da Werfen, superestimaram e subestimaram o efanosoctocog alfa, respectivamente. Os ensaios cromogênicos de FVIII superestimaram em 2-3 vezes a atividade esperada (Pipe, 2009). Portanto, é necessário avaliar cuidadosamente se os ensaios disponíveis em cada laboratório de hemostasia são adequados para o monitoramento exato de cada EHL usado como terapia de reposição em seu centro. As Tabelas 17 e 18 apresentam exemplos de concentrados de rFVIII e rFIX de EHL, como a potência do produto foi atribuída e se OSA ou CSA são aceitáveis para uso no monitoramento da atividade pós-infusão.

Tabela 17. Moléculas de FVIII de EHL

Nome	Empresa	Molécula	Rótulo de potência	OSA	CSA	Referências
Adynovi/ Adynovate Rurioctocog alfa pegol	Takeda	FVIII 2 x 10 kDa PEG	CSA	Resultados variados	Sim	Turecek et al, 2016 Bulla et al, 2017
Afstyla Ionoctocog alfa	CSL Behring	FVIII BDD de cadeia única	CSA	Resultados são aproxima- damente metade do CSA	CSA	Bowyer et al, 2017 St Ledger et al, 2018
Elocta/ Eloctate efmorocotocog	Sobi	Fusão FVIII FC	CSA	Sim	Sim	Sommer et al, 2014 Powell et al, 2012 Pouplard et al, 2020
Esperoct Turoctocog alfa pegol	Novo Nordisk	rFVIII truncado no BD 40 kDa PEG	CSA	Resultados variados	Sim	Pickering et al, 2016 Hillarp et al, 2017
Jivi Damocotocog alfa pegol	Bayer	rFVIII BDD 60 kDa PEG	CSA	Não reagentes de TTPA de sílica ou caulim	Sim	Gu et al, 2014 Church et al, 2018
Altuvioct/ Altuviio Efanosoctocog alfa	Sanofi	rFVIII FC- VWF-XTEN	OSA	Actin FSL recomendado	Superestima 2-3 vezes	Pipi et al, 2024

Tabela 18. Moléculas de FIX de EHL

Nome	Empresa	Molécula	Rótulo de potência	OSA	CSA	Referências
Alprolix etrenonacog	Sobi	Fusão rFIX FC	OSA	Não alguns reagentes de TTPA de sílica ou caulim	Sim	Sommer et al, 2014 Bowyer et al, 2019 Persson et al, 2018
Idelvion albutrepenonacog	CSL Behring	Fusão rFIX albumina	OSA	Resultados variados	Não	Persson et al, 2018 St Ledger et al, 2016 Kitchen et al, 2017 Horn et al, 2019 Pouplard et al, 2019
Refixia/Rebinyon Nonacog beta pegol	Novo Nordisk	rFIX 40 kDa PEG	OSA	Apenas Cephascreeen e Synthafax validados	Sim	Bowyer et al, 2016 Tiefenbacher et al, 2017 Young et al, 2016

Anticorpos Biespecíficos:

Medição de anticorpos biespecíficos: os anticorpos biespecíficos são uma classe de terapia de não reposição para hemofilia A. Eles agem como ponte entre o FIXa humano e o FX humano, na ausência de FVIII, promovendo a ativação de FX. Os anticorpos biespecíficos diferem do FVIII original em vários aspectos intrínsecos, incluindo a ausência de mecanismos regulatórios, o que impacta os ensaios de hemostasia (Lenting et al, 2017). Gerações futuras e mais potentes de anticorpos biespecíficos podem ter um impacto maior nos testes de hemostasia (Bowyer et al, 2023).

TTPA e anticorpos biespecíficos: anticorpos biespecíficos não requerem ativação para participar da ativação de FX. Na presença de anticorpos biespecíficos, o TTPA é drasticamente reduzido, frequentemente abaixo do limite inferior da faixa de referência (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). O TTPA não é sensível o suficiente a alterações na concentração de anticorpos biespecíficos para ser usado no monitoramento dessas terapias; no entanto, prolongamento do TTPA em um paciente com TTPA anteriormente curto pode indicar perda de eficácia ou adesão (Druzgal et al, 2020; Valsecchi et al, 2021).

OSA e anticorpos biespecíficos: na presença de anticorpos biespecíficos, ensaios padrão, calibrados com plasma e baseados em TTPA, incluindo FVIII, FIX, FXI, XII, proteína C, proteína S e tempo de coagulação ativada (TCA), superestimam a quantidade de fator de coagulação ou inibidor natural, sendo, portanto, inadequados para uso (Bowyer et al, 2023; EMA, 2018).

OSA de FVIII modificado e anticorpos biespecíficos: calibradores comerciais específicos para o produto (padrão/referência) e plasmas de controle de qualidade estão disponíveis para a primeira geração de anticorpos biespecíficos. O ensaio de FVIII de um estágio pode ser modificado usando esses calibradores específicos para o produto juntamente com maior diluição do plasma (diluições de 1/40 ou 1/80 em vez de 1/10) para medir a concentração do fármaco no anticorpo biespecífico em µg/mL. Esse ensaio modificado também medirá qualquer FVIII endógeno ou de reposição presente no plasma (Bowyer et al, 2020).

FVIII cromogênico e anticorpos biespecíficos: CSA de FVIII que contêm FX e FIXa humanos são sensíveis à presença de anticorpos biespecíficos e medem alguma atividade de FVIII semelhante “mimética ou substituta” (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). CSA humano pode ser usado como marcador da presença de anticorpos biespecíficos em pacientes que recebem profilaxia. Isso não é intercambiável com o nível de concentração do fármaco detalhado acima. O CSA humano também medirá qualquer FVIII endógeno ou de reposição presente no plasma (Bowyer et al, 2020). CSA de FVIII que contêm FX bovino e FIXa humano ou bovino são insensíveis à presença de anticorpos biespecíficos de primeira geração, mas podem demonstrar alguma sensibilidade a anticorpos biespecíficos de próxima geração (Bowyer et al, 2020; Bowyer et al, 2023). CSA de FX bovino deve ser usado para medir qualquer

FVIII endógeno ou terapia de reposição de FVIII e para medir o FVIII residual no ensaio de inibidor de Bethesda, conforme detalhado abaixo.

Ensaio de inibidor de Bethesda e anticorpos biespecíficos: a medição de FVIII residual após incubação nos ensaios de inibidor de Bethesda geralmente é feita por OSA (Verbruggen B, 1995), embora medições cromogênicas e fluorogênicas tenham sido validadas (Miller et al, 2021). Na presença de anticorpos biespecíficos, OSA não pode ser utilizado, portanto, CSA deve ser usado. É importante que o kit de CSA utilizado contenha FX bovino e FIXa humano ou bovino para excluir o efeito do anticorpo biespecífico, caso contrário, o título do inibidor será subestimado (Bowyer et al, 2021; Miller et al, 2021).

Monitoramento Pós-Infusão de FVIII e FIX: o monitoramento pós-infusão de concentrados de FVIII ou FIX, derivados de plasma ou recombinantes, de meia-vida padrão é necessário para o manejo clínico do paciente com hemofilia. Resposta menor do que a esperada ou meia-vida reduzida pode indicar a necessidade de terapia adicional ou possível desenvolvimento de inibidores. A medição da terapia de reposição deve, idealmente, ser realizada com o mesmo método e mesmos reagentes de ensaio que foram originalmente utilizados para atribuir a potência ao produto. Caso isso não seja possível, deve-se utilizar um ensaio alternativo validado. Na Europa, a rotulagem de potência para concentrados de FVIII é feita por CSA (Barrowcliffe et al, 2002) e para concentrados de FIX é feita por OSA (Kitchen et al, 2016). A *Food and Drug Administration* (FDA, 2020) [Agência de Controle de Alimentos e Medicamentos] dos Estados Unidos recomenda o uso de OSA para concentrados de FIX, porém alguns concentrados de FVIII têm potência atribuída por OSA e outros por CSA. A WFH recomenda o uso de um ensaio de FVIII ou FIX validado para uso com o concentrado específico utilizado no tratamento e calibrado com um padrão de plasma rastreável em relação ao padrão internacional vigente da OMS (Srivastava et al, 2020). Outras diretrizes recomendam o uso de OSA ou CSA calibrados com padrões de plasma para monitorar concentrados de FVIII derivados de plasma, a menos que haja evidências em contrário, e o uso de um OSA para concentrados de FIX (Gray et al, 2020). As Tabelas 19 e 20 apresentam exemplos de concentrados de FVIII e FIX derivados de plasma e recombinantes de meia-vida padrão comumente disponíveis, como a potência do produto foi atribuída e se OSA ou CSA são aceitáveis para uso no monitoramento da atividade pós-infusão.

Tabela 19. Exemplos de concentrados derivados de plasma

Concentrado	Fator	Atribuição de potência	CSA	OSA	Referências
Factane	VIII	CSA	Sim	Sim	Adcock et al, 2018
Octanate	VIII	CSA	Sim	Sim	
FVIII 8Y	VIII	CSA	Sim	Sim	
Haemoctin	VIII	CSA	Sim	Sim	
Octaplex	VIII	CSA	Sim	Sim	
Recombinate	VIII	CSA	Sim	Sim	Jennings et al, 2007
Fanhdi	VIII	CSA	Sim	Sim	Peyvandi et al, 2016
Hemofil M	VIII	CSA	Sim	Sim	Peyvandi et al, 2016
Emoclot	VIII	CSA	Sim	Sim	Peyvandi et al, 2016
Replenine	IX	OSA		Sim	
Betafact	IX	OSA Pathromtin SL (sílica)	Provavelmente aceitável	Sim	Adcock et al, 2018
Mononine	IX	OSA Pathromtin SL (sílica)	Sim	Sim	Bowyer et al, 2016 Wilmot et al, 2014
Octafix	IX	OSA Pathromtin SL (caulim)	Sem dados	Sim	
Alphanine	IX	OSA		Sim	Aznar et al, 2009

Tabela 20. Exemplos de concentrados recombinantes de meia-vida padrão

Concentrado	Fator	Atribuição de potência	CSA	OSA	Referências
Advate	FVIII - comprimento total	CSA	Sim	Sim	Kitchen et al, 2016 Kitchen et al, 2019
Refacto AF	FVIII-BDD	CSA	Sim	Sim, com padrão lab Refacto	Kitchen et al, 2016 Morfini et al, 2003 Ingerslev et al, 2004
Novo8	FVIII-BDD	CSA	Sim	Sim, mas alguma superestimação nos níveis mínimos	EMA, 2021 Viuff et al, 2011
Nuwiq	FVIII-BDD	CSA	Sim	Sim	Lissitchkov et al, 2016 EMA, 2022 Klukowska et al, 2016 Tiefenbacher et al, 2019
Xyntha	FVIII-BDD	OSA	Não - superestimação	Sim	FDA, 2020
Kovaltry	FVIII	CSA	Sim	Sim	Mahlangu et al, 2018 Kitchen et al, 2016
Benefix	IX	OSA	Dados insuficientes	Sim	Bowyer et al, 2016 Kershaw et al, 2018 Sommer et al, 2014
Rixubis	IX	OSA Pathromtin SL validado	Sim	Sim	Kershaw et al, 2018 Gritsch et al, 2014

Terapia Gênica: hemofilia A e B são doenças monogênicas e, portanto, candidatas ideais para manipulação genética. Uma gama variada de estratégias de terapia gênica, incluindo edição genética, tem sido pesquisada em humanos para as duas doenças desde o início dos anos 2000 (De Wolf et al, 2023). Em meados da década de 2020, aprovação regulatória foi concedida em alguns países para o uso limitado de produtos de terapia gênica no tratamento de pessoas com hemofilia A ou B. A medição da expressão do transgene FVIII ou FIX é essencial para determinar a duração da resposta e se terapias adicionais são necessárias para obter hemostasia. Para minimizar a variabilidade interlaboratorial, é sensato restringir o monitoramento de rotina a um número limitado de laboratórios especializados em hemostasia em cada país. Estudos clínicos de diversas terapias gênicas relataram variabilidade nos ensaios, com atividades cromogênicas de FVIII e FIX 1,5 a 3,0 vezes menores do que as atividades de um estágio. Diferenças foram relatadas entre reagentes no mesmo método de ensaio. Em razão das restrições de volume de plasma adequado, é difícil conduzir estudos multicêntricos de comparação de laboratórios em amostras de pacientes que receberam terapia gênica. Entretanto, foram disponibilizados dados limitados sobre a medição das moléculas candidatas de FVIII ou FIX utilizando uma variedade de métodos ou reagentes. Sempre que possível, para minimizar a variabilidade, os reagentes e métodos usados nos estudos clínicos farmacêuticos devem ser utilizados pelos laboratórios para monitorar a expressão pós-terapia gênica (Tabela 21).

Tabela 21. Terapia gênica para hemofilia A e B

	Farmacêutica	Nome comercial	Método de ensaio	Reagentes
Hemofilia A				
Valoctocogene roxaparvovec	Biomarin	Roctavian	CSA	Coatest SP4
Hemofilia B				
Etranacogene dezaparvovec	CSL Behring	Hemgenix	OSA	Synthasil
Fidanacogene elaparvovec	Pfizer	Beqvez	OSA	Synthasil

Terapia gênica para hemofilia A: todas as abordagens para hemofilia A usaram vetores AAV e FVIII recombinante com domínio B deletado (BDD). Estudos de Fase 1–3 do Roctavian (AAV5-FVIII-SQ, Valoctocogene roxaparvovec, Biomarin) mediram o transgene FVIII:C por CSA com Coatest SP4 e OSA usando o reagente para TTPA Actin FSL da Siemens no analisador BCS XP da Siemens (Rangarajan et al, 2017). O FVIII:C no CSA foi aproximadamente metade do FVIII:C no OSA (Mahlangu et al, 2023). Rosen et al relataram resultados comparáveis entre CSA com Coatest SP4 e da Hyphen Biomed ao medir AAV5-FVIII-SQ (4). Uma comparação entre dois centros de FVIII:C medido por OSA ou CSA no plasma de pacientes após terapia com Roctavian relatou uma diferença aproximada de 1,65 vezes entre OSA e CSA. Resultados semelhantes de FVIII:C foram obtidos com o CSA da Hyphen Biomed e dois outros CSA (Platton et al, 2024). Os autores concluíram que os OSA não eram adequados para medição de FVIII após terapia gênica com Roctavian, e apenas CSA deveria ser usado.

Terapia gênica para hemofilia B: os dois produtos para hemofilia B atualmente aprovados, Hemgenix (Etranacogene dezaparvovec, CSL Behring) e Beqvez (Fidanacogene elaparvovec, Pfizer), usam uma variante de FIX altamente ativa e de ocorrência natural, FIX-Padua (R338L) (Simioni et al, 2009). Programas farmacêuticos relataram atividade de FIX apenas por OSA em seus relatórios de estudo. Variabilidade entre reagentes e metodologias foi relatada ao medir FIX-Padua após expressão gênica e em plasma enriquecido com a molécula de FIX-Padua. Um estudo de campo global de plasma enriquecido com uma molécula de R338L recombinante (FLT180a, verbrinacogene setparvovec, pela Freeline Therapeutics, que está atualmente pausado no final dos testes de fase 1/2) relatou uma diferença de 3 vezes na atividade de FIX entre 15 OSA e CSA diferentes. Variação de 1,8 vezes foi observada entre 13 reagentes de TTPA no OSA, enquanto os resultados de ambos os CSA foram aproximadamente metade da atividade esperada medida por OSA com Synthasil (Foley et al, 2023). A medição da atividade do transgene FIX-Padua Beqvez destacou diferenças de ensaio entre cinco reagentes de TTPA no OSA entre OSA e CSA (Robinson et al, 2021). Em um estudo de campo global que usou plasma de participantes do estudo de Fase 1/2a de terapia gênica, FIX:C foi mais alto com o reagente de TTPA ativado por sílica, Synthasil, no OSA do que com os reagentes de TTPA ativados por ácido elágico, Actin FS e Actin FSL, ou CSA (Pittman et al, 2024). Foram disponibilizados dados laboratoriais mínimos sobre a medição da atividade de FIX após terapia gênica com Hemgenix. O Resumo das Características do Produto afirma que a atividade de FIX é menor por CSA do que OSA (EMA, 2024). Estudos clínicos de Fase 1–3 de FIX usaram o reagente de TTPA Synthasil no OSA e um CSA não divulgado; as atividades de FIX por OSA foram pelo menos duas vezes maiores do que com CSA (Pipe et al, 2023; Miesbach et al, 2018).

Aspectos Laboratoriais para Tratamento com Terapia de Reequilíbrio da Hemostasia: as terapias de não reposição de fator para hemofilia A ou B visam promover a coagulação e reequilibrar a hemostasia, tendo como alvo anticoagulantes ou inibidores naturais da coagulação, incluindo antitrombina, inibidor da via do fator tecidual (TFPI), proteína C ou proteína S (Nogami and Shima, 2023). Algumas dessas terapias foram aprovadas para uso em determinados grupos de pacientes, outras estão atualmente em estudos farmacêuticos.

Moléculas que têm como alvo a antitrombina: a antitrombina (AT) ativada por heparina exerce ações inibitórias sobre a trombina, FXa, FIXa, FXIa e FXIIa (Rezaie et al, 2020). Uma pequena molécula de RNA interferente, o fitusiran, que tem como alvo a síntese de AT nos hepatócitos, foi desenvolvida para melhorar a geração de trombina (Young et al, 2023). Em estudos clínicos, redução de 82–87% na AT foi associada a aumento da geração de trombina (Pasi et al, 2021). Os níveis alvo de atividade de AT são de 15–35 UI/dL. Os ensaios de AT estão bem estabelecidos como

parte dos testes de trombofilia, mas é raro medir atividades de AT tão baixas. Um estudo de campo comparativo global de laboratórios que avaliou a medição de uma série de atividades de AT (9–100 UI/dL) concluiu que alguns ensaios de AT não devem ser usados para monitorar a AT durante o tratamento com fitusiran (Chhabra et al, 2024).

Moléculas que têm como alvo o TFPI: os anticorpos anti-TFPI têm como alvo o domínio Kunitz 2 do TFPI e impedem a ligação ao FX ativado, permitindo assim a continuidade da geração de FXa (Mast et al, 2022). O primeiro anticorpo monoclonal anti-TFPI (concizumabe, Novo Nordisk, Dinamarca) foi aprovado para uso em 2023 em pacientes canadenses com hemofilia B com inibidores. Um anticorpo anti-TFPI alternativo, o marstacimabe (Pfizer, EUA), está sendo considerado para aprovação nos EUA e na Europa para pessoas com hemofilia A ou B sem inibidores (Matino et al, 2023). Ensaios de TFPI estão disponíveis em alguns laboratórios de pesquisa ou especializados, mas a utilidade clínica da medição não é clara.

Moléculas que têm como alvo a proteína C ativada (APC): a APC, em conjunto com o cofator proteína S, inativa o FVa e o FVIIIa para impedir a geração adicional de trombina. FV Leiden é uma mutação p.Arg506Gln (c.1691G>A) no sítio primário de clivagem da APC no FV ativado. A presença de FV Leiden retarda a inativação de FVa pela APC e é a causa mais comum de trombofilia em humanos (Van Cott et al, 2016). Abordagens alternativas que visam a APC estão sendo investigadas em estudos clínicos. Foi relatado que um anticorpo monoclonal humanizado que inibe a proteína C ativada restabelece a hemostasia em camundongos hemofílicos (Jiang et al, 2023), e foram iniciados estudos em humanos de um inibidor de serina protease (serpina) que tem como alvo apenas a APC, e não a proteína C precursora (Baglin et al, 2023). Ensaios de proteína C e APC estão disponíveis rotineiramente em muitos laboratórios terciários de hemostasia, caso seja necessária a medição para o monitoramento de medicamentos.

Moléculas que têm como alvo a proteína S: a proteína S é um cofator para TFPI e APC que agem restringindo a geração de trombina. Foi relatado que o uso de um pequeno RNA interferente que tem como alvo a proteína S melhora a hemostasia em camundongos com hemofilia (Prince et al, 2020), e um anticorpo contra a proteína S tem sido usado para potencializar a terapia de reposição de FIX na geração de trombina em pacientes com hemofilia B (Wilson et al, 2024). Proteína S livre e proteína S total, que também medem a proteína S complexada com o regulador do complemento, proteína de ligação C4b, estão rotineiramente disponíveis em muitos laboratórios terciários de hemostasia, caso seja necessária a medição para o monitoramento de medicamentos.

Ensaios de geração de trombina: os ensaios de geração de trombina (TG) são ensaios globais que conseguem avaliar o potencial hemostático geral e destacar hiper ou hipocoagulabilidade no plasma (Ninivaggi et al, 2021). Existem diversos ensaios cromogênicos ou fluorogênicos de TG, internos e comerciais, que comumente desencadeiam a TG usando fator tecidual, FXIa ou FIXa. Em razão da falta de padronização, há baixa correlação entre eles (Devreese et al, 2007). Apesar dessas questões, ensaios de TG são frequentemente utilizados em estudos farmacêuticos para avaliar o efeito de novas moléculas na hemostasia.

Referências

- Adcock DM, Strandberg K, Shima M, Marlar RA. Advantages, disadvantages and optimization of one-stage and chromogenic factor activity assays in haemophilia A and B. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(6): 621-629.
- Aznar JA, Cabrera N, Matysiak M, Zawilska K, Gercheva L, Antonov A, Montañés M, Páez AM, Lissitchkov T. Pharmacokinetic study of a high-purity factor IX concentrate (factor IX Grifols) with a 6-month follow up in previously treated patients with severe haemophilia b. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1243-1248.
- Baglin T, Huntington JA, Koch A, Mocanu I, Makhaldiani L. Serpin-PC in persons with severe hemophilia (PwH): Updated results from a multicenter multi-part, first-in-human study. *Blood* 2023; 142(Supplement 1) :2619.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Barrowcliffe TW, Raut S, Sands D, Hubbard AR. Coagulation and chromogenic assays of factor VIII activity: General aspects, standardization, and recommendations. *Semin Thromb Hemost* 2002; 28(3): 247-256.

- Bowyer A, Gray E, Lowe A, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W, Jenkins PV. Laboratory coagulation tests and recombinant porcine factor VIII: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2022; 28(3): 515-519.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Bowyer A, Kitchen S, Maclean R. Measurement of antifactor VIII antibody titre in the presence of emicizumab; Use of chromogenic Bethesda assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): O204-O206.
- Bowyer AE, Duncan EM, Antovic JP. Role of chromogenic assays in haemophilia A and B diagnosis. *Haemophilia* 2018; 24(4): 578-583.
- Bowyer AE, Ezban M, Kitchen S. Measuring the FVIII mimetic activity of the new bispecific antibody, Mim8, in severe haemophilia A plasma using APTT and one-stage FVIII assays. *Res Pract Thromb Haemost* 2021; 5: Abstract PB0680.
- Bowyer AE, Goodeve AC, Liesner R, Mumford AD, Kitchen S, Makris M. p.Tyr365Cys change in factor VIII: haemophilia A, but not as we know it. *Br J Haem* 2011; 154(5): 618-625.
- Bowyer AE, Gosselin RC. Factor VIII and factor IX activity measurements for hemophilia diagnosis and related treatments. *Semin Thromb Hemost* 2022; 49(06): 609-620.
- Bowyer AE, Hillarp A, Ezban M, Persson P, Kitchen S. Measuring factor IX activity of nonacog beta pegol with commercially available one-stage clotting and chromogenic assay kits: A two-center study. *J Thromb Haemost* 2016; 14(7): 1428-1435.
- Bowyer AE, Kitchen S, Ezban M. The effect of a next generation factor VIII mimetic bispecific antibody (Mim8) on assays of factor VIII activity and thrombin generation. *J Thromb Haemost* 2023; 21(3): 480-487.
- Bowyer AE, Kitchen S, Maclean RM. Effects of emicizumab on APTT, one-stage and chromogenic assays of factor VIII in artificially spiked plasma and in samples from haemophilia A patients with inhibitors. *Haemophilia* 2020; 26(3): 536-542.
- Chhabra ES, Sadeghi-Khomami A, Liu M, Young G, Pipe SW, Ozelo MC, Le-Camus C, Toh M, Lima-Montalvo SA, Demissie M. Global comparative antithrombin (AT) field study: Impact of laboratory assay variability on the assessment of AT activity measurement (abstract PP-072). *Haemophilia* 2024; 30: 3-223.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of coagulation factor activities using the one-stage clotting assay, 2nd edition. CLSI standard H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.
- De Wolf D, Singh K, Chuah MK, VandenDriessche T. Hemophilia gene therapy: The end of the beginning? *Hum Gene Ther* 2023; 34(17-18): 782-792.
- Devreese K, Wijns W, Combes I, Van kerckhoven S, Hoylaerts MF. Thrombin generation in plasma of healthy adults and children: chromogenic versus fluorogenic thrombogram analysis. *Thromb Haemost* 2007; 98(3): 600-613.
- Druzgal CH, Kizilacak H, Brown J, Sennett M, Young G. Neutralizing antidrug antibody to emicizumab in a patient with severe hemophilia A with inhibitors: New case with detailed laboratory evaluation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(9): 2205-2208.
- European Medicines Agency (EMA). Hemlibra (emicizumab) Summary of Product Characteristics. 2018. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemlibra-epar-product-information_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). NovoEight (turoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/novoeight-epar-product-information_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). Hemgenix (etranacogene dezaparvovec) Summary of Product Characteristics. 2024. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/hemgenix-epar-product-information_en.pdf.
- European Medicines Agency (EMA). Nuwiq (simoctocog alfa) Summary of Product Characteristics. 2022. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/nuwiq-epar-product-information_en.pdf.
- Foley JH, Shehu E, Riddell A, Gray E, Goodale A, Yu IM et al. Differences in wild-type- and R338L-tenase complex formation are at the root of R338L-factor IX assay discrepancies. *Blood Adv* 2023; 7(3): 458-467.
- Food and Drug Administration (FDA). Xyntha (antihemophilic factor [recombinant]) Prescribing Information. 2020. <https://www.fda.gov/media/70399/download>.

Gray E, Kitchen S, Bowyer AE, Chowdary P, Jenkins PV, Murphy P et al. Laboratory measurement of factor replacement therapies in the treatment of congenital haemophilia: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26(1): 6-16.

Gritsch H, Romeda-Finger S, Scheiflinger F, Turecek PL. Potency assignment and measurement of recombinant FIX activity in human plasma – impact of aPTT reagents on the 1-stage clotting assay. *Haemophilia* 2014; 20(s3): 37 (abstract).

Ingerslev J, Jankowski MA, Weston SB, Charles LA. Collaborative field study on the utility of a BDD factor VIII concentrate standard in the estimation of BDDr factor VIII:C activity in hemophilic plasma using one-stage clotting assays. *J Thromb Haemost* 2004; 2(4): 623-628.

Jenkins PV, Bowyer AE, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P et al. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26: 151-155.

Jennings I, Kitchen DP, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Emerging technologies and quality assurance: the United Kingdom National External Quality Assessment Scheme perspective. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(3): 243-249.

Jiang M, Yang F, Jiang Y, Cheng L, Han J, Yi J et al. Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models. *Blood* 2023; 142(12): 1071-1081.

Kershaw GW, Dissanayake K, Chen VM, Khoo T. Evaluation of chromogenic FIX assays by automated protocols. *Haemophilia* 2018; 24(3): 492-501.

Kitchen S, Beckmann H, Katterle Y, Bruns S, Tseneklidou-Stoeter D, Maas Enriquez M. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII: results from an International comparative laboratory field study. *Haemophilia* 2016; 22(3): e192-e199.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Clotting and chromogenic factor VIII assay variability in post-infusion and spiked samples containing full-length recombinant FVIII or recombinant factor VIII Fc fusion protein (rFVIII-Fc). *Int J Lab Hematol* 2019; 41(2): 176-183.

Kitchen S, Jennings I, Makris M, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Factor VIII assay variability in postinfusion samples containing full length and B-domain deleted FVIII. *Haemophilia* 2016; 22(5): 806-812.

Kitchen S, Katterle Y, Beckmann H, Maas Enriquez M. Chromogenic assay for BAY 81-8973 potency assignment has no impact on clinical outcome or monitoring in patient samples. *J Thromb Haemost* 2016; 14(6): 1192-1199.

Kitchen S, Kershaw GW, Tiefenbacher S. Recombinant to modified factor VIII and factor IX – chromogenic and one-stage assay issues. *Haemophilia* 2016; 22: 72-77.

Klukowska A, Szczepański T, Vdovin V, Knaub S, Jansen M, Liesner R. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (Human-cl rhFVIII, Nuwiq®) in children with severe haemophilia A: efficacy, safety and pharmacokinetics. *Haemophilia* 2016; 22(2): 232-239.

Lenting PJ, Denis CV, Christophe OD. Emicizumab, a bispecific antibody recognising coagulation factors IX and X: how does it actually compare to factor VIII? *Blood* 2017; 130: 2463-2468.

Lissitchkov T, Hampton K, von Depka M, Hay C, Rangarajan S, Tuddenham E et al. Novel, human cell line-derived recombinant factor VIII (human-cl rhFVIII; Nuwiq®) in adults with severe haemophilia A: efficacy and safety. *Haemophilia* 2016; 22(2): 225-231.

Mahlangu J, Kaczmarek R, von Drygalski A, Shapiro S, Chou S, Ozelo MC et al. Two-year outcomes of valoctocogene roxaparvovec therapy for hemophilia A. *New Eng J Med* 2023; 388(8): 694-705.

Mahlangu JN, Ahuja SP, Windyga J, Church N, Shah A, Schwartz L. BAY 81-8973, a full-length recombinant factor VIII for the treatment of hemophilia A: product review. *Ther Adv Hematol* 2018; 9(7): 191-205.

Mast AE, Ruf W. Regulation of coagulation by tissue factor pathway inhibitor: Implications for hemophilia therapy. *J Thromb Haemost* 2022; 20(6): 1290-1300.

Matino D, Acharya S, Palladino A, Hwang E, McDonald R, Taylor CT et al. Efficacy and safety of the anti-tissue factor pathway inhibitor marstacimab in participants with severe hemophilia without inhibitors: Results from the phase 3 Basis trial. *Blood* 2023; 142(Supplement 1): 285.

- Miesbach W, Meijer K, Coppens M, Kampmann P, Klamroth R, Schutgens R et al. Gene therapy with adeno-associated virus vector 5-human factor IX in adults with hemophilia B. *Blood* 2018;131(9):1022-31.
- Miller CH, Boylan B, Payne AB, Driggers J, Bean CJ. Validation of the chromogenic Bethesda assay for factor VIII inhibitors in hemophilia A patients receiving Emicizumab. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): e84-e86.
- Miller CH, Rice AS, Boylan B, Shapiro AD, Lentz SR, Wicklund BM et al. Comparison of clot-based, chromogenic, and fluorescence assays for measurement of factor VIII inhibitors in the U.S. Hemophilia Inhibitor Research Study. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1300-1309.
- Morfini M, Cinotti S, Bellatreccia A, Paladino E, Gringeri A, Mannucci PM. A multicenter pharmacokinetic study of the B-domain deleted recombinant factor VIII concentrate using different assays and standards. *J Thromb Haemost* 2003; 1(11): 2283-2289.
- Moser KA, Smock KJ. Direct oral anticoagulant (DOAC) interference in hemostasis assays. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2021; 2021(1): 129-133.
- Nederlof A, Kitchen S, Meijer P, Cnossen MH, Ali Pour N, Kershaw GW et al. Performance of factor IX extended half-life product measurements in external quality control assessment programs. *J Thromb Haemost* 2020; 18: 1874-1883.
- Ninivaggi M, de Laat-Kremers R, Tripodi A, Wahl D, Zuily S, Dargaud Y et al. Recommendations for the measurement of thrombin generation: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5): 1372-1378.
- Nogami K, Shima M. Current and future therapies for haemophilia—Beyond factor replacement therapies. *Br J Haematol* 2023; 200(1): 23-34.
- Pasi KJ, Lissitchkov T, Mamonov V, Mant T, Timofeeva M, Bagot C et al. Targeting of antithrombin in hemophilia A or B with investigational siRNA therapeutic fitusiran-Results of the phase 1 inhibitor cohort. *J Thromb Haemost* 2021; 19(6): 1436-1446.
- Pavlova A, Delev D, Pezeshkpoor B, Muller J, Oldenburg J. Haemophilia A mutations in patients with non-severe phenotype associated with a discrepancy between one-stage and chromogenic factor VIII activity assays. *Thromb Haemost* 2014; 111(5): 851-861.
- Peyvandi F, Oldenburg J, Friedman KD. A critical appraisal of one-stage and chromogenic assays of factor VIII activity. *J Thromb Haemost* 2016; 14(2): 248-261.
- Pipe SW, Leebeek FW, Recht M, Key NS, Castaman G, Miesbach W et al. Gene therapy with etranacogene dezaparvovec for hemophilia B. *New Engl J Med* 2023; 388(8): 706-718.
- Pipe SW, Sadeghi-Khomami A, Konkle BA, Kitchen S, Negrier C, Liu M, et al. A global comparative field study to evaluate the factor VIII activity of efanesoctocog alfa by one-stage clotting and chromogenic substrate assays at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia*. 2024;30(1):214-23.
- Pittman DD, Carrier C, Soares H, McKay J, Tan CY, Liang JZ et al. Field study and correlative studies of factor IX variant FIX-R338L in participants treated with fidanacogene elaparvovec. *Thromb Haemost* 2024; 124(10): 912-921.
- Platton S, Raheja P, Dale C, Guy S, Yartey N, Bowyer A. Evaluation of one-stage and chromogenic assays for the laboratory measurement of factor VIII activity following valoctocogene roxaparvovec infusion. *Haemophilia* 2024; 30(5): 1221-1224.
- Pouplard C, Trossaert M, A LEQ, Delahousse B, Giraudeau B, Gruel Y. Influence of source of phospholipids for APTT-based factor IX assays and potential consequences for the diagnosis of mild haemophilia B. *Haemophilia* 2009; 15(1): 365-368.
- Prince RE, Schaeper U, Dames S, Calzavarini S, Quarroz C, Reina Caro MD et al. Targeting protein S using small interfering RNA is well tolerated and protects mice with hemophilia A from acute hemarthrosis. *Blood* 2020; 136(Supplement 1): 20-21.
- Rangarajan S, Walsh L, Lester W, Perry DJ, Madan B, Laffan M. AAV5-factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *N Engl J Med* 2017; 377(26): 2519-2530.
- Rezaie AR, Giri H. Anticoagulant and signaling functions of antithrombin. *J Thromb Haemost* 2020; 18(12): 3142-3153.

Robinson M, George L, Carr ME, Samuelson-Jones BJ, Arruda VR, Murphy JE et al. Factor IX assay discrepancies in the setting of liver gene therapy using a hyperfunctional variant factor IX-Padua. *J Thromb Haemost* 2021; 19(5):1212-1218.

Rosen S, Tiefenbacher S, Robinson M, Huang M, Srimani J, Mackenzie D et al. Activity of transgene-produced B-domain-deleted factor VIII in human plasma following AAV5 gene therapy. *Blood* 2020; 136(22): 2524-2534.

Rosen S. Assay of factor VIII:C with a chromogenic substrate. *Scand J Haematol* 1984; 33(suppl 40): 139-145.

Ruinemans-Koerts J, Peterse-Stienissen I, Verbruggen B. Non-parallelism in the one-stage coagulation factor assay is a phenomenon of lupus anticoagulants and not of individual factor inhibitors. *Thromb Haemost* 2010; 104(5): 1080-1082.

Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP et al. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361: 1671-1675.

Sommer JM, Buyue Y, Bardan S, Peters RT, Jiang H, Kamphaus GD et al. Comparative field study: impact of laboratory assay variability on the assessment of recombinant factor IX Fc fusion protein (rFIXFc) activity. *Thromb Haemost* 2014; 112(5): 932-940.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH Guidelines for the Management of Hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26(suppl 6): 1-158.

Tiefenbacher S, Clausen WHO, Hansen M, Luthoft R, Ezban M. A field study evaluating the activity of N8-GP in spiked plasma samples at clinical haemostasis laboratories. *Haemophilia* 2019; 25: 893-901.

Truedsson Å, Schmidt DE, Strålfors A, Soutari N, Norberg E, Letelier A et al. One-stage versus chromogenic factor IX activity in haemophilia B [abstract]. *Res Pract Thromb Haemost* 2020;4.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L et al. Characterization of the neutralizing anti-emizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Van Cott EM, Khor B, Zehnder JL. Factor V Leiden. *Am J Hematol* 2016; 91(1): 46-49.

Verbruggen B, Giles AR, Samis J, Verbeek K, Mensink E, Novakova I. The type of factor VIII deficient plasma used influences the performance of the Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII inhibitors. *Throm Haemost* 2001; 86: 1435-1439.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *Throm Haemost* 1995; 72(2): 247-251.

Viuff D, Barrowcliffe TW, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. Viuff D, Barrowcliffe T, Saugstrup T, Ezban M, Lillicrap D. International comparative field study of N8 evaluating factor VIII assay performance. *Haemophilia* 2011; 17(4): 695-702.

Wilmot HV, Hogwood J, Gray E. Recombinant factor IX: discrepancies between one-stage clotting and chromogenic assays. *Haemophilia* 2014; 20(6): 981-987.

Wilson HP, Pierre A, Paysse AL, Kumar N, Cooley BC, Rudra P et al. Protein S antibody as an adjunct therapy for hemophilia B. *Blood Advances* 2024; 8(2): 441-452.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Young G, Lenting PJ, Croteau SE, Nolan B, Srivastava A. Antithrombin lowering in hemophilia: a closer look at fitusiran. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(4): 100179.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.

TÓPICOS ABORDADOS

- | | |
|--|--|
| ✓ Diferentes Cinéticas de Anticorpos | ✓ Protocolo para o Teste de Inibidores de FVIII e FIX |
| ✓ Amostras para Teste de Inibidores de FVIII/FIX: Coleta, Envio e Preparação | ✓ Ensaios de Inibidores do Fator de von Willebrand |
| ✓ Pool de Plasma Normal para Teste de Inibidor | ✓ Anticorpo Antidroga (ADA) no Laboratório de Coagulação - Emicizumabe |

Identificar o desenvolvimento de anticorpos é vital para que o programa de tratamento da hemofilia possa oferecer cuidados médicos adequados (Peyvandi et al, 2016; Srivastava et al, 2020). No contexto da hemofilia, os inibidores são anticorpos IgG policlonais contra FVIII ou FIX e principalmente da subclasse IgG4 de alta afinidade (Montalvão et al, 2015). Os inibidores neutralizam o concentrado de fator administrado ao paciente, dificultando a prevenção e o tratamento de sangramentos (Pratt et al, 2021). O surgimento de inibidores é resultado de um processo de múltiplas etapas que envolve determinantes ambientais e genéticos. Na hemofilia A grave, inibidores de FVIII se formam em aproximadamente 30% dos pacientes, geralmente durante os primeiros 20–30 dias de exposição. Na hemofilia B grave, a incidência cumulativa de desenvolvimento de inibidores é menor do que na hemofilia A grave e chega a 4%–5% 9 a 11 dias após a exposição (Ljung et al, 2019). O tratamento de sangramento agudo em pacientes com inibidores depende do título do inibidor. Pacientes com baixa título de inibidor (<5 UB/mL) podem ser tratados com terapia de reposição padrão, concentrado de fator, embora sejam necessárias doses mais altas para anular os efeitos neutralizantes do inibidor. Para pacientes com inibidores de alto título (>5 UB/mL), as únicas terapias eficazes para tratar o sangramento são os agentes de bypass (Ljung et al, 2019). Os três agentes de bypass disponíveis usados na hemofilia A e B são (1) concentrado de complexo de protrombina ativado (aPCC), (2) duas formas de FVII ativado recombinante (rFVIIa) e (3) FVIII suíno recombinante. Medicamentos hemostáticos recentemente desenvolvidos, como anticorpos biespecíficos humanizados (por exemplo, emicizumabe), RNA de interferência (por exemplo, fitusiran) e agentes anti-inibidor do fator tecidual (anti-TFPI), entre outros, estão disponíveis em alguns países para prevenir sangramentos. A indução de tolerância imunológica (ITI) é usada para erradicar inibidores e envolve injeções intravenosas frequentes de concentrado de fator ao longo de um período de meses. Na hemofilia A, a ITI é eficaz em cerca de 65 a 70% dos pacientes. O monitoramento do título do inibidor desses pacientes é essencial para avaliar e gerenciar o protocolo. A investigação laboratorial do inibidor deve ser realizada por meio do método de Bethesda modificado. Embora esse teste tenha alto CV, é o teste de referência utilizado para titular anticorpos inibitórios. Em alguns casos, triagem de inibidores utilizando o teste de TTPA pode ser realizada antes da titulação dos anticorpos. Contudo, em razão das limitações do teste, resultados negativos não devem ser usados para excluir a possível presença de um inibidor. Mais informações podem ser encontradas no capítulo 6 deste manual. Uma alternativa à triagem de anticorpos contra FVIII ou FIX é o uso de um teste imunológico. Diversos ensaios imunológicos foram estudados e, embora sejam mais sensíveis do que os testes funcionais, não diferenciam entre anticorpos inibitórios e não inibitórios e, portanto, ainda não são úteis na prática clínica para detectar ou monitorar inibidores funcionais. No entanto, estudos demonstraram que os anticorpos da subclasse IgG4 estão correlacionados com inibidores funcionais de FVIII e FIX (Awasthi et al, 2022; Montalvão et al, 2015; Moorehead et al, 2015).

Diferentes Cinéticas de Anticorpos: diferentes cinéticas de anticorpos podem afetar a análise dos dados e, conseqüentemente, levar a interpretações errôneas. Quando os inibidores de FVIII ou FIX agem em um teste de inibição de forma dose-dependente, como inativando completamente o FVIII ou o FIX, esses inibidores são denominados inibidores do “Tipo I”. Inibidores que demonstram comportamento cinético mais complexo são geralmente chamados de inibidores do “Tipo II”, inativando o FVIII de forma incompleta. Os inibidores do tipo I geralmente se desenvolvem

em pacientes com hemofilia A ou B congênita em resposta ao concentrado de FVIII ou FIX, enquanto os inibidores do tipo II geralmente ocorrem em pacientes com hemofilia adquirida ou hemofilia A leve. Os inibidores do tipo I de FVIII são dependentes do tempo e da temperatura porque seu alvo, o FVIII, está complexado com sua proteína transportadora, o FVW. Os inibidores de FIX não são dependentes do tempo e da temperatura.

Amostras para Teste de Inibidores de FVIII/FIX: Coleta, Envio e Preparação:

Coleta e envio de amostras: as amostras para os ensaios de inibidores de FVIII e FIX são coletadas em citrato trissódico 3,2% (0,105–0,109 M), o mesmo tipo de amostra usado na maioria dos testes de coagulação. O sangue total citratado deve ser centrifugado em até 4 horas após a coleta de sangue, e a centrifugação deve ser de 1500 g por 15 minutos. Amostras de plasma positivas para inibidores de FVIII e FIX, não sangue total, podem ser armazenadas em temperatura ambiente por 1 semana ou congeladas a -70°C e armazenadas por até 15 anos. É importante lembrar que, diferentemente dos procedimentos tradicionais de análise de coagulação, nesse tipo de amostra, é o anticorpo que deve ser preservado. Essa informação é muito útil para laboratórios que precisam enviar amostras para outro laboratório para teste, pois o transporte não depende de gelo seco.

Aquecimento das amostras: amostras de pacientes utilizadas para detecção de inibidores podem conter FVIII ou FIX exógeno devido a infusões recentes de concentrado de fator, como: (1) profilaxia, (2) tratamento de sangramento, (3) terapia de ITI ou (4) FVIII ou FIX endógeno se o teste for realizado em hemofilia leve ou moderada. A presença de FVIII ou FIX exógeno pode afetar significativamente a detecção de inibidores, com subestimação do título do inibidor e resultados falso-negativos (Batty et al, 2014; De Lima Montalvão et al, 2015). O aquecimento das amostras por 30 minutos a 56°C dissocia o complexo antígeno-anticorpo e desnatura o fator. Para padronizar o teste, recomenda-se que todas as amostras de teste sejam sempre pré-aquecidas, mesmo que não se espere a presença de FVIII ou FIX exógeno. O procedimento de aquecimento deve ser seguido por uma etapa de centrifugação, de 2 minutos a 4000 g, para remover os resíduos no plasma causados pelo aquecimento. Essa etapa de aquecimento das amostras para o teste de inibidores não foi avaliada em relação a todos os produtos disponíveis para tratamento de pacientes. Portanto, para cada produto de FVIII ou FIX molecularmente modificado, deve ser demonstrado se FVIII ou FIX residual se deteriora devido ao procedimento de aquecimento. Emicizumabe não é destruído pela etapa de pré-aquecimento, porém os inibidores de FVIII podem ser medidos na presença de emicizumabe usando o método cromogênico de FVIII bovino. Vale lembrar que alguns pacientes usam concentrado de fator e emicizumabe concomitantemente, por isso o tratamento térmico é necessário.

Diluição da amostra: para titular o inibidor, o teste deve ser realizado com várias diluições do plasma de teste. A maneira como o fator de diluição é selecionado não se limita a um número específico, pois depende do conhecimento do título anterior do inibidor.

Pool de Plasma Normal para Teste de Inibidor: para avaliar a atividade do inibidor na amostra de teste, é necessário apresentar uma fonte “externa” de FVIII ou FIX para esse inibidor. Essa fonte externa é baseada no pool de plasma normal, por isso é importante considerar que qualquer erro nesta etapa pode gerar resultados falso-positivos e falso-negativos. Ao preparar um pool para teste de inibidor, a atividade de FVIII ou FIX deve ser medida e o desvio desse valor deve ser monitorado ao longo do período de armazenamento ou ao produzir um novo lote. Um pool de plasma normal deve ser usado para garantir que o nível de FVIII ou FIX esteja próximo de 1 UI/mL (100%). Um nível mais baixo de fator no pool de plasma normal pode resultar em superestimação do título do inibidor, enquanto um nível mais alto de fator pode resultar em subestimação do título do inibidor. Um desvio máximo de 5% de 1 UI/mL de FVIII ou FIX no pool de plasma normal é aceitável. A fonte externa de FVIII ou FIX pode ser produzida pela preparação do pool de plasma normal ou a partir de uma fonte comercial e pode ser congelada ou liofilizada. Um mínimo de 20 doadores é sugerido para obter plasma com nível de FVIII ou FIX próximo de 1 UI/mL. O FVIII é um fator de coagulação termolábil, o que significa que durante incubação de 2 horas a 37°C, haverá perda significativa da atividade de FVIII causada por uma alteração no pH. Para estabilizar o pH durante a incubação, o plasma normal usado deve ser tamponado. Isso pode ser feito usando tampão imidazol ou tampão HEPES.

Protocolo para o Teste de Inibidores de FVIII e FIX: em 1975, Kasper et al. descreveram um método para determinar inibidores de FVIII e FIX e, até hoje, esse ainda é o teste mais padronizado, conhecido como teste de Bethesda.

Em 1995, foi descrito o método Nijmegen, uma modificação do ensaio de Bethesda, com algumas diferenças: (1) a introdução de um pool tamponado para melhorar a estabilidade do FVIII durante a incubação, e (2) plasma deficiente em FVIII para uso na mistura de controle. Esse método Bethesda modificado foi recomendado pela *International Society on Thrombosis and Haemostasis* (ISTH) [Sociedade Internacional de Trombose e Hemostasia] como método de referência para o teste de inibidor de FVIII (Verbruggen et al, 1995). O teste de inibidor é um método indireto e baseia-se no princípio da inativação do fator de coagulação de uma fonte externa conhecida pelo inibidor presente na amostra de teste durante um período de incubação. Uma unidade Bethesda é definida como a quantidade de inibidor que neutralizará 50% de uma unidade de FVIII adicionada em 2 horas a 37°C.

Reagentes e equipamentos:

- Tampão de diluição (parte 1)
- Tampão imidazol ou HEPES (abaixo)
- Pool de plasma normal (parte 2)
- Plasma deficiente em FVIII
- Cefalina (reagente de TTPA)
- Tubos plásticos

Tabela 22. Tampão imidazol ou HEPES

Tampão	
Imidazol	Misture 1 parte de tampão imidazol 4M com 39 partes de pool de plasma normal. Após a mistura, o pH deve ser ajustado para entre 7,3 e 7,5.
HEPES	Misture 1 parte de tampão HEPES 1M com 9 partes de pool de plasma normal. Após a mistura, o pH deve ser ajustado para um valor entre 7,3 e 7,5.

Método: prepare diluições do plasma de teste em tubos plásticos até um volume final de 0,2 mL usando o tampão de diluição. As diluições necessárias para cada paciente podem variar. Um ponto de partida sugerido seria começar com uma amostra não diluída e depois realizar diluições de 1/2, 1/4, 1/8, etc.

Observação: se o paciente já tiver realizado um ensaio de inibidor, o nível pode fornecer uma indicação aproximada de quais diluições devem ser utilizadas. Pipete 0,2 mL de plasma deficiente em FVIII para outro tubo plástico. Este servirá como tubo de controle.

Observação: no ensaio de Bethesda original, tampão imidazol foi usado para preparar uma mistura de controle com o pool de plasma normal. No ensaio de Nijmegen, o tampão imidazol é substituído por plasma deficiente em FVIII. Algumas diferenças foram observadas entre o uso de plasma deficiente em fator imunodepletado, plasma quimicamente depletado e plasma congenitamente deficiente. Essas diferenças podem ser causadas pela ausência ou presença de FVW no plasma, presença de anticorpos ou presença de fragmentos de FVIII. Como o FVW está presente no pool de plasma normal, não é necessário que o diluente da mistura de controle também contenha FVW e, para reduzir custos, o plasma deficiente em fator pode ser substituído por albumina sérica bovina (BSA) a 4%. A BSA tamponada a 4% é um substituto confiável e econômico para plasma de FVIII ou FIX e favorece a padronização do método.

- ✓ Adicione 0,2 mL de pool de plasma normal tamponado ao tubo de controle e às diluições de plasma de teste. O nível de FVIII de todos os tubos será de aproximadamente 0,5 UI/mL. Isso significa que o pool de plasma normal tamponado contém 1 UI/mL de FVIII.
- ✓ Tampe, misture e incube todos os tubos a 37°C por 2 horas.
- ✓ Após 2 horas, transfira todos os tubos para um banho de gelo, a menos que o ensaio de FVIII seja realizado imediatamente.
- ✓ Realize o teste de FVIII em todas as misturas de incubação usando o método habitual de ensaio de FVIII, método de um estágio ou método cromogênico (Parte 6).
- ✓ Leia o FVIII residual de cada mistura de teste, usando o controle como 100% (0,5 UI/mL).

Ensaio de inibidor de fator

Parte 1



Parte 2

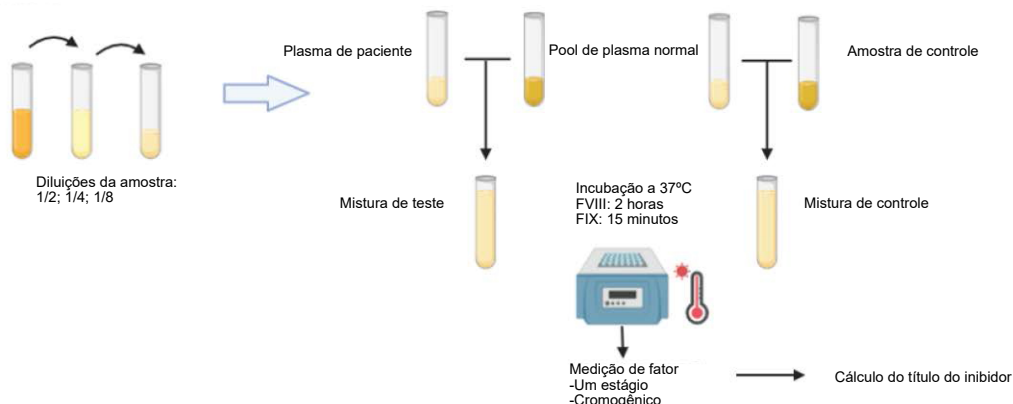


Figura 8. Procedimentos do ensaio de inibidor

Resultados e interpretação: a diluição que fornece FVIII residual mais próximo de 50%, mas dentro da faixa de 25% a 75%, é escolhida para o cálculo do inibidor. Qualquer FVIII residual <25% ou >75% não deve ser usado nos cálculos do nível de inibidor. Um gráfico de % de FVIII residual versus unidades de inibidor pode ser feito em papel log-log a partir da definição da unidade de inibidor. Leia o nível de inibidor correspondente ao FVIII residual para cada mistura de teste e corrija a diluição. Por exemplo, se o valor mais próximo de 50% do fator residual foi constatado na diluição de 1/4 (ou seja, na mistura 1/4 + pool normal), o resultado, que será próximo de 1 Unidade Bethesda (UB), deve ser multiplicado por 4.

- ✓ Diluição de 1/4 + pool normal
- ✓ FVIII residual = 50%
- ✓ Unidade de inibidor (do gráfico) = 1 UB
- ✓ Multiplicação pelo fator de diluição (1/4) = 4 UB

Observação: o ensaio de inibidor baseia-se na determinação do FVIII ou FIX residual da mistura de plasma de teste e controle previamente incubada. Os ensaios de Bethesda e Nijmegen foram desenvolvidos utilizando um ensaio de fator de coagulação de um estágio. No entanto, o teste de inibidores por meio desse ensaio apresenta limitações. A formação de coágulo neste teste pode ser afetada, por exemplo, pelo anticoagulante lúpico (inibidores não específicos da coagulação) e por medicamentos como o emicizumabe. Uma alternativa para evitar esses problemas é o uso de um método cromogênico. Outra vantagem do uso de um método cromogênico em vez de um ensaio de coagulação é a maior exatidão dos resultados. Uma amostra de paciente não diluída com atividade residual >75% pode ser relatada como <0,4 UB/mL. Para inibidores de FVIII, o Comitê Científico e de Padronização (SSC) da ISTH recomenda considerar um resultado $\geq 0,6$ UB/mL como positivo. Além da curva de calibração, o título do inibidor pode ser calculado usando a fórmula: $(2 - \log \%RA) / 0,301$. No caso de um inibidor do tipo I, a curva do plasma de teste de um paciente mostra paralelismo com a curva de calibração. Não paralelismo com a curva de calibração indica um padrão de inibidor do tipo II com cinética diferente. Para inibidores com cinética tipo II, use a menor diluição que se aproxime de 50% da atividade residual para o cálculo final do título do inibidor.

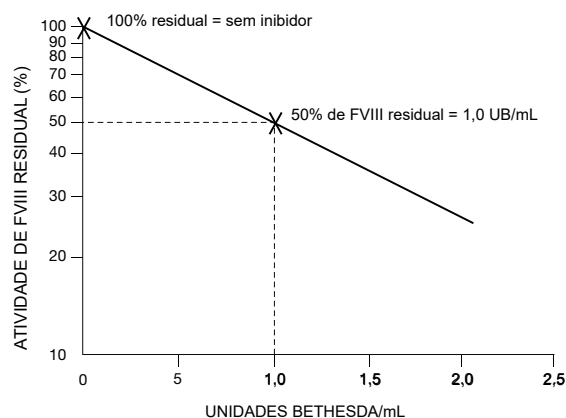


Figura 9. Cálculo de atividade de fator residual

Observações: os inibidores funcionais da hemostasia mais frequentemente encontrados são os anticoagulantes lúpicos, que não são direcionados contra fatores de coagulação específicos e cuja presença deve ser excluída antes da realização de testes para inibidores de fatores específicos. A quantificação do título do inibidor é realizada em laboratório, preferivelmente por meio do ensaio de Bethesda modificado por Nijmegen Bethesda, pois essa modificação oferece maior especificidade e sensibilidade em comparação ao ensaio de Bethesda original. Resultados positivos para inibidor de FVIII abaixo de 2,0 UB podem ser confirmados com o método cromogênico, que apresenta menor interferência analítica e maior exatidão em comparação ao método de um estágio. O método cromogênico também é a melhor opção se houver suspeita de anticoagulantes lúpicos na amostra de teste ou se a amostra contiver anticoagulantes terapêuticos, como heparina ou inibidores diretos de FXa ou FIIa. Anticorpos anti-FVIII não neutralizantes que não são detectados pelo ensaio de Nijmegen-Bethesda podem ser clinicamente relevantes, pois podem aumentar o clearance de FVIII e podem ser medidos por ELISA.

Ensaio de Inibidores do Fator de von Willebrand: a DVW é considerada o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum conhecido em humanos, com prevalência populacional de 1% e prevalência sintomática de 1 em 1000 (Bowman et al, 2010). As opções de tratamento incluem a infusão de concentrados de FVW, que geralmente também contêm FVIII, administrados para prevenir ou tratar episódios hemorrágicos. Aloanticorpos contra FVW apresentam prevalência entre 7 e 9,5% (James et al, 2013; Pagliari et al, 2023). Nesses casos, o tratamento com concentrados de FVW é ineficaz, e episódios de anafilaxia foram relatados com exposição subsequente ao FVW (James et al, 2013). Como já sabemos, a deficiência de FVW pode ser explicada por diferentes mecanismos resultantes dos tipos de defeitos genéticos identificados. Essa variabilidade de defeitos genéticos contribui para uma heterogeneidade de inibidores que têm como alvo diferentes epítomos da molécula de FVW. Por esse motivo, a detecção laboratorial desses anticorpos é desafiadora (Connell et al, 2021; Miller, 2021; Sarji et al, 1974). Em 1974, Sarji et al (1974) relataram pela primeira vez um caso de aloanticorpo contra FVW em um paciente politransfundido. O inibidor de FVW foi medido usando um método análogo ao método de Bethesda para inibidores de FVIII (Sarji et al, 1974). Embora não haja padronização na identificação de inibidores de FVW, o método de Bethesda tem sido utilizado pela maioria dos laboratórios (Favaloro et al, 2022), com a diferença de utilizar métodos que avaliam a atividade do FVW em vez do teste de FVIII ou FIX. Atualmente, existem diferentes tipos de métodos disponíveis para detecção da atividade do FVW, com diferentes sensibilidades e especificidades, por isso é importante considerar que essa variabilidade de métodos influencia a sensibilidade e a especificidade da detecção desses inibidores (Favaloro et al, 2022). Os anticorpos contra FVW não têm a característica de serem dependentes do tempo e da temperatura, podendo ser avaliados imediatamente após o teste de mistura (Sarji et al, 1974). O método clássico do cofator de ristocetina, que avalia a interação do FVW com plaquetas fixadas na presença de ristocetina, assim como o método de avaliação de colágeno e o método de ganho de função, são opções que já foram avaliadas e demonstraram ser métodos com boa sensibilidade e estabilidade, apesar de apresentarem resultados diferentes conforme discutido acima. Outros métodos disponíveis ainda não foram avaliados para esse tipo de investigação. Métodos imunológicos também foram descritos e detectam anticorpos neutralizantes e não neutralizantes. Em relação ao desenvolvimento de autoanticorpos que caracterizam a DVW

adquirida, pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMPs) são um subgrupo que apresenta complicações hemorrágicas relacionadas à atividade do FVW. Resultados falsos são observados em amostras de pacientes com NMPs, dependendo da tecnologia aplicada. A investigação laboratorial de inibidores de FVW caracterizados por aloanticorpos e autoanticorpos deve ser realizada com cautela, tendo em vista as diferentes possibilidades metodológicas. O desempenho de todos os métodos modernos atualmente disponíveis ainda não está claro (Noye et al, 2024; Favaloro et al, 2022).

Anticorpo Antidroga (ADA) no Laboratório de Coagulação - Emicizumabe: emicizumabe é um anticorpo biespecífico que se liga a FIX/FIXa e FX/FXa humanos e age como mimético da função do FVIII. No entanto, não é regulado pelos mecanismos que regulam o FVIII (Mahlangu et al, 2018, Mahlangu et al, 2022). O teste de triagem de TTPA é consideravelmente reduzido pelo emicizumabe (ou seja, abaixo da faixa de referência, independentemente dos reagentes utilizados). Emicizumabe afeta todos os testes e ensaios laboratoriais baseados em TTPA. Emicizumabe também interfere nos ensaios cromogênicos que medem FVIII usando FIXa e FX humanos, mas não naqueles que usam FIXa e FX de origem bovina (Bowyer et al, 2021; Jenkins et al, 2020). Emicizumabe pode ser medido e relatado em µg/mL por meio de ensaio de um estágio modificado com maior diluição de amostra e calibrado com calibradores específicos para emicizumabe. Anticorpos antidroga (ADAs) podem se desenvolver após uma dose única ou administração repetida de uma proteína terapêutica e podem afetar a farmacocinética, a farmacodinâmica, a eficácia e/ou a segurança dessa proteína terapêutica. Estudos que avaliam as características de ADA em pacientes tratados com emicizumabe mostram que o teste de TTPA pode ser prolongado em conjunto com episódios hemorrágicos na presença de anticorpos com ação neutralizante (Novembrino et al, 2023; Valsecchi et al, 2021). Nesse caso, quando o nível de emicizumabe foi medido, mostrou redução significativa. A atividade neutralizante desses anticorpos não foi claramente identificada em métodos funcionais, mesmo no ensaio de Bethesda modificado (Kaneda et al, 2021). O nível da unidade Bethesda identificada parece ser menor do que o esperado em comparação ao teste que mede o nível de emicizumabe. O papel dos testes funcionais para ADA ainda não foi estabelecido, mas eles podem ser complementares à medição do nível plasmático do medicamento nesses casos. A WFH recomenda a medição dos níveis de emicizumabe por meio de ensaio de um estágio modificado com maior diluição da amostra e calibrado com calibradores específicos para emicizumabe (Srivastava et al, 2020).

Referências

- Awasthi NP, Tiwari V, Riaz K, Arshad S, Husain N. Revealing and IgG4 analysis to factor VIII in haemophilia-A patients with and without inhibitors. *Transfus Apher Sci* 2022; 61(3): 103343.
- Batty P, Platton S, Bowles L, Pasi KJ, Hart DP. Pre-analytical heat treatment and a FVIII ELISA improve factor VIII antibody detection in acquired haemophilia A. *Br J Haematol* 2014; 166(6): 953-956.
- Bowman M, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, James P. The prevalence of symptomatic von Willebrand disease in primary care practice. *J Thromb Haemost* 2010; 8(1): 213-216.
- Bowyer AE, Lowe AE, Tiefenbacher S. Laboratory issues in gene therapy and emicizumab. *Haemophilia* 2021; 27 Suppl 3: 142-147.
- Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021; 5(1): 301-325.
- de Lima Montalvão SA, Tucunduva AC, de Almeida Sambo AL, De Paula EV, de Souza Medina S, Ozelo MC. Heat treatment of samples improve the performance of the Nijmegen-Bethesda assay in hemophilia A patients undergoing immune tolerance induction. *Thromb Res* 2015; 136(6): 1280-1284.
- Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S, Vong R, Mohammed S. Evaluating errors in the laboratory identification of von Willebrand disease using contemporary von Willebrand factor assays. *Pathology* 2022; 54(3): 308-317.
- James PD, Lillicrap D, Mannucci PM. Alloantibodies in von Willebrand disease. *Blood* 2013; 122(5): 636-640.
- Jenkins PV, Bowyer A, Burgess C, Gray E, Kitchen S, Murphy P, Platton S, Riddell A, Chowdary P, Lester W. Laboratory coagulation tests and emicizumab treatment a United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation guideline. *Haemophilia* 2020; 26(1): 151-155.

Kaneda M, Kawasaki R, Matsumoto N, Abe H, Tashiro Y, Inokuchi Y et al. Detailed analysis of anti-emicizumab antibody decreasing drug efficacy, using plasma samples from a patient with hemophilia A. *J Thromb Haemost* 2021; 19(12): 2938-2946.

Ljung R, Auerswald G, Benson G, Dolan G, Duffy A, Hermans C et al. Inhibitors in haemophilia A and B: Management of bleeds, inhibitor eradication and strategies for difficult-to-treat patients. *Eur J Haematol* 2019; 102(2): 111-122.

Mahlangu J, Iorio A, Kenet G. Emicizumab state-of-the-art update. *Haemophilia* 2022; 28 Suppl 4(Suppl 4): 103-110.

Mahlangu J, Oldenburg J, Paz-Priel I, Negrier C, Niggli M, Mancuso ME et al. Emicizumab prophylaxis in patients who have hemophilia A without inhibitors. *N Engl J Med* 2018; 379(9): 811-822.

Miller CH. Monitoring of von Willebrand factor inhibitors in patients with type 3 von Willebrand disease using a quantitative assay. *Haemophilia* 2021; 27(5): 823-829.

Montalvão SA, Tucunduva AC, Siqueira LH, Sambo AL, Medina SS, Ozelo MC. A longitudinal evaluation of anti-FVIII antibodies demonstrated IgG4 subclass is mainly correlated with high-titre inhibitor in haemophilia A patients. *Haemophilia* 2015; 21(5): 686-692.

Moorehead PC, Thibeault L, Tuttle A, Grabell J, Dwyre L, Silva M, James P, Lillicrap D. Rapid acquisition of immunologic tolerance to factor VIII and disappearance of anti-factor VIII IgG4 after prophylactic therapy in a hemophilia A patient with high-titer factor VIII inhibitor. *J Pediatr Hematol Oncol* 2015; 37(4): e220-222.

Novembrino C, Boscolo-Anzoletti M, Galbiati E, Shinohara S, Peyvandi F. Effect of emicizumab-neutralizing antibodies on activated partial thromboplastin time-based clotting time test results in patients treated with emicizumab. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(8): 102260.

Noye J, Beggs J, Mason J. Discrepant low von Willebrand factor activity results on the ACL TOP analyzer are frequent in unselected patients with myeloproliferative neoplasms and show no correlation with high-molecular-weight multimer loss or bleeding phenotype. *J Thromb Haemost* 2024; 22(4): 965-974.

Pagliari MT, Budde U, Baronciani L, Eshghi P, Ahmadinejad M, Badiie Z et al. Von Willebrand factor neutralizing and non-neutralizing alloantibodies in 213 subjects with type 3 von Willebrand disease enrolled in 3WINTERS-IPS. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 787-799.

Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: Diagnosis, treatments, and its complications. *Lancet* 2016; 388(10040): 187-197.

Pratt KP, Arruda VR, Lacroix-Desmazes S. Inhibitors-Recent insights. *Haemophilia* 2021; 27 Suppl 3: 28-36.

Sarji KE, Stratton RD, Wagner RH, Brinkhous KM. Nature of von Willebrand factor: A new assay and a specific inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71(8): 2937-2941.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

Valsecchi C, Gobbi M, Beeg M, Adams T, Castaman G, Schiavone L, Huntington JA, Peyvandi F. Characterization of the neutralizing anti-emicizumab antibody in a patient with hemophilia A and inhibitor. *J Thromb Haemost* 2021; 19(3): 711-718.

Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: Improved specificity and reliability. *Thromb Haemost* 1995; 73(2): 247-251.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Ensaios de Atividade de Ligação Plaquetária do FVW - Nitty S. Mathews
- ✓ Antígeno de Von Willebrand - Tulasí Geevar
- ✓ Ensaio de Ligação do Fator de Von Willebrand ao Colágeno - Tulasí Geevar
- ✓ Ensaio de Ligação ao Fator VIII - Tulasí Geevar
- ✓ Multímeros do Fator de Von Willebrand - Annette Bowyer
- ✓ Interpretação dos Testes de Von Willebrand - Tulasí Geevar
- ✓ Variáveis Pré-analíticas no Diagnóstico de DVW - Tulasí Geevar
- ✓ Testes no Repertório para Diagnóstico de DVW - Tulasí Geevar
- ✓ Diagnóstico de Doença de Von Willebrand no Cenário de Poucos Recursos - Tulasí Geevar

Ensaios de Atividade de Ligação Plaquetária do FVW (Ensaios de Atividade do FVW): com todas as diretrizes utilizando a relação VWF:RCo/VWF:Ag para determinar se o paciente tem DVW tipo 1 (quantitativa) ou tipo 2 (qualitativa), o papel da atividade de ligação de VWF:glicoproteína Ib (GPIb) é de extrema importância na classificação da DVW. Um painel de diretrizes multidisciplinares estabelecido pela *American Society of Hematology* (ASH) [Sociedade Americana de Hematologia], ISTH, *National Hemophilia Foundation* [Fundação Nacional de Hemofilia] (NHF, agora *National Bleeding Disorders Foundation* (NBDF) [Fundação Nacional de Distúrbios Hemorrágicos]) e WFH sugere a realização de ensaios mais recentes que medem a atividade de ligação plaquetária do FVW (por exemplo, VWF:GP1bM e VWF:GP1bR) em vez do ensaio convencional de cofator de ristocetina do FVW (VWF:RCo) [Recomendação 4] (James et al, 2021). O painel considerou que os novos ensaios apresentaram benefícios moderados, refletindo o menor CV e a maior reprodutibilidade em comparação com VWF:RCo. O ensaio de VWF:GP1bR requer a presença de ristocetina adicionada e, portanto, pode estar sujeito aos mesmos problemas que o ensaio de VWF:RCo em relação aos polimorfismos de ligação à ristocetina. Entretanto, ele utiliza um fragmento de GP1b recombinante em vez de plaquetas. Em contraposição, o ensaio de VWF:GP1bM utiliza uma molécula de GPIb α recombinante que contém diversas mutações de ganho de função; consequentemente, essa variante de GP1b liga-se ao domínio A1 do FVW mesmo na ausência de ristocetina (Laffan et al, 2014). Em um estudo de EQA de 2022 sobre o programa de testes de proficiência em FVW do *College of American Pathologists* [Colégio Americano de Patologistas] (Salazar et al, 2022), o CV geral para VWF:RCo variou de 14,6% a 23,5% para resultados em amostras normais e de 24,3% a 44,8% para resultados em amostras com baixa atividade. Os CVs foram menores para VWF:GP1bM e VWF:Ab, variando de 8,0% a 34,8%, incluindo amostras normais e anormais. Um estudo que comparou diferentes ensaios de atividade de ligação VWF:GP1b relatou que a sensibilidade e a especificidade para diferenciar entre DVW tipo 1 e tipo 2, com base nas relações atividade/antígeno usando um ponto de corte de 0,7, foram 92% e 72,4% para VWF:RCo, 84% e 89,7% para GP1bR e 92% e 85,1% para GP1bM (Vangenechten et al, 2018).

Tabela 23. Resumo dos ensaios automatizados de atividade do FVW disponíveis comercialmente

Atividade do FVW – nomenclatura da ISTH	Princípio	Ensaios	Método de detecção
VWF:RCO	Agregação de plaquetas liofilizadas induzida por ristocetina	1. Siemens Reagente de BC von Willebrand (Siemens, Marburg, Alemanha) 2. STA-VWF:Rco (Diagnostica Stago, França)	Aglutinação de plaquetas liofilizadas
VWF:GP1bR	Ligação de FVW a um fragmento de GPIb recombinante induzida por ristocetina	1. HemosIL Atividade do Cofator de Ristocetina do FVW 2. HemosIL AcuStar Atividade do Cofator de Ristocetina do FVW (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EUA)	Aglutinação de esferas de látex 2. Quimioluminescência
VWF:GP1bM	Ligação de FVW a um fragmento de GPIb com mutação de ganho de função sem ristocetina	Siemens Innovance VWF Ac (Siemens, Marburg, Alemanha)	Aglutinação de esferas de látex
VWF:Ab	Ligação de anticorpo monoclonal a um epítipo do domínio A1 do FVW (sítio de ligação plaquetária)	HemosIL Atividade do FVW (Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EUA)	Aglutinação de esferas de látex

Aviso geral: os kits de reagentes/protocolos listados abaixo foram validados em um ou mais analisadores de coagulação pelo fabricante para otimizar o desempenho do produto e atender às especificações do produto. Modificações definidas pelo usuário podem não ser compatíveis, pois podem afetar o desempenho do sistema e os resultados do ensaio. É de responsabilidade do usuário validar modificações nessas instruções ou o uso dos reagentes em analisadores que não estejam incluídos nas Fichas de Aplicação ou nas Instruções de Uso específicas do fabricante.

Ensaios de atividade do FVW automatizados:

Ensaio do cofator de ristocetina do FVW (VWF:RCO): diluições de um padrão (cujo valor do cofator de ristocetina é conhecido) são preparadas e misturadas com plaquetas liofilizadas, de modo que uma quantidade conhecida de cofator seja adicionada às plaquetas. A agregação induzida por ristocetina é então medida e uma curva padrão é traçada. As amostras de teste são tratadas de forma semelhante e o valor do cofator de ristocetina é calculado a partir do gráfico do padrão. Amostra primária: Plasma citratado.

Reagentes:

- ✓ Plaquetas liofilizadas fixadas (Reagente de BC von Willebrand⁵, Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemanha)
- ✓ Solução salina normal
- ✓ Plasma de calibração
- ✓ Plasma de paciente e plasmas de controle (controle normal [por exemplo: plasma de controle N] e controle anormal de nível baixo [por exemplo: plasma de controle P])
- ✓ Reagente de ristocetina (por exemplo: Revohem, 25 mg/mL; reconstitua com 0,625 mL de água destilada e misture bem)
- ✓ Água destilada

Preparação dos reagentes:

- ✓ Primeiro reconstitua o reagente de Von Willebrand com 4 mL de água destilada e dilua com 7 mL de solução salina. Verifique a contagem de plaquetas, que deve estar entre 2.000.000 e 2.050.000/cumm. Adicione 50,0 µL de reagente de ristocetina para 950 µL de plaquetas.
- ✓ Reconstitua o plasma calibrador com exatamente 1 mL de água destilada. Deixe o material reconstituído em temperatura ambiente (18–25°C) por 30 minutos. Em seguida, agite o frasco suavemente antes de usar. O material permanece estável por 8 horas a 15–25°C. Pode ser congelado e armazenado a -80°C ou menos.
- ✓ Plasma de controle anormal (plasma de controle P). Reconstitua o plasma de controle P com exatamente 1 mL de água destilada ou deionizada. Agite cuidadosamente para dissolver sem formação de espuma e deixe em temperatura ambiente (18–25°C) por 15 minutos. Antes de usar, agite novamente com cuidado.
- ✓ Controle normal (plasma de controle N). Reconstitua o plasma de controle N com exatamente 1 mL de água destilada ou deionizada. Agite cuidadosamente para dissolver sem formação de espuma e deixe em temperatura ambiente (18–25°C) por 30 minutos. Antes de usar, agite novamente com cuidado.

Procedimento:

- ✓ Os reagentes necessários (plaquetas liofilizadas com ristocetina), solução salina normal e calibrador são carregados no analisador de coagulação.
- ✓ A curva padrão é executada.
- ✓ Após o término da calibração, a curva de calibração deve ser revisada e validada. A curva validada é a curva de calibração utilizada na determinação dos resultados.
- ✓ Analise a amostra de teste.

Protocolo de CQ:

Analise o controle normal (plasma de controle N) e o controle anormal de nível baixo (plasma de controle P).

Observação: Os controles e o plasma calibrador precisam ser adquiridos separadamente.

Possível interferência:

- ✓ Plaquetas não diluídas corretamente.
- ✓ Alteração na concentração de ristocetina.

Interpretação dos resultados:

Os resultados são relatados em %.

Valores esperados (avaliados no sistema BCS; Siemens, Marburg, Alemanha):

Grupo sanguíneo	% de normalidade
Todos (n = 185)	58–172
O	49–142
A+B+AB	66–183

Ensaio de VWF:GPIbR (HemosIL® AcuStar Atividade do Cofator de Ristocetina do FVW®; Instrumentation Laboratory, MA, EUA): este ensaio é um imunoensaio de duas etapas que quantifica a atividade de VWF:RCO em plasma humano citratado, utilizando partículas magnéticas como fase sólida e um sistema de detecção quimioluminescente. Na primeira etapa, a amostra é misturada com o tampão de ensaio contendo ristocetina e as partículas magnéticas são revestidas com um fragmento recombinante do receptor plaquetário glicoproteína de FVW (rGPIbα) por meio de um anticorpo monoclonal específico que orienta o fragmento de GPIbα de forma adequada a interagir com o FVW da amostra de paciente na presença de ristocetina. O FVW presente na amostra liga-se às partículas magnéticas

de maneira proporcional à atividade do seu cofator de ristocetina. Após separação magnética e lavagem, um anticorpo monoclonal anti-FVW marcado com isoluminol é adicionado e incubado em uma segunda etapa. Após nova separação magnética e lavagem, dois acionadores são adicionados e a reação quimioluminescente resultante é medida em unidades relativas de luz (RLUs) pelo sistema óptico ACL AcuStar. Isso é proporcional à concentração da atividade de VWF:RCo na amostra.

Amostra primária: plasma citratado.

Reagentes (composição do kit):

- ✓ Cartucho de VWF:RCo para 25 determinações

Cada cartucho contém 1 frasco de suspensão de partículas magnéticas revestidas com rGP1b α por meio de um anticorpo monoclonal de camundongo específico, 1 frasco de tampão de ensaio contendo sulfato de ristocetina, 1 frasco de marcador contendo um anticorpo monoclonal de camundongo anti-FVW marcado com isoluminol e 1 frasco de diluente de amostra. Os reagentes estão em tampão citrato ou HEPES contendo BSA, IgG de camundongo, estabilizantes e conservantes.

- ✓ Calibrador 1 de VWF:RCo: Solução salina de HEPES contendo BSA, IgG de camundongo, estabilizantes e conservantes.
- ✓ Calibrador 2 de VWF:RCo: Plasma humano liofilizado contendo tampão, estabilizantes e conservantes.

Preparação/procedimento:

- ✓ Inverta o cartucho suavemente 30 vezes, evitando a formação de espuma.
- ✓ Após a ressuspensão completa das micropartículas, coloque o cartucho sobre uma superfície sólida e remova cuidadosamente a aba de transporte do cartucho.
- ✓ Pressione as duas abas nas laterais da tampa perfurante (cor cinza) e aplique pressão na parte superior do cartucho até que ele se encaixe.
- ✓ Assim que o cartucho estiver firme, carregue-o no instrumento.
- ✓ Os frascos de calibrador diluído são transferidos para os respectivos tubos plásticos com código de barras e carregados no analisador (ACL AcuStar).
- ✓ A curva padrão é executada.
- ✓ Após o término da calibração, a curva de calibração deve ser revisada e validada. A curva validada é a curva de calibração utilizada na determinação dos resultados.
- ✓ Analise a amostra de teste.

Controle de qualidade:

- ✓ Recomenda-se o uso de dois controles de nível (adquiridos separadamente).
- ✓ Cada laboratório deve estabelecer sua própria média e desvio padrão.

Rastreabilidade de calibradores e controles:

Os valores relatados foram determinados em múltiplas execuções no sistema ACL AcuStar, utilizando lotes específicos de reagentes e em relação a um padrão interno, cujo valor foi atribuído em relação ao material de referência internacional atual para FVW e FVIII.

Resultados:

Os resultados de VWF:RCo são relatados em % que equivale a UI/dL.

Tabela 24. Valores esperados para VWF:RCo

Tipo sanguíneo ABO	Número de amostras testadas	HemosIL AcuStar VWF:RCo (VWF:GP1bR)
Todos	287	45,6 – 176,3%
O	163	43,8 – 161,5%
A+B+AB	124	53,8 – 210,8%

Observação: recomenda-se que cada laboratório estabeleça suas próprias faixas normais de VWF:RCo, dependendo da população atendida e da técnica, método e equipamento utilizados. Linearidade: 0,5–200,0%. Limite de detecção: 0,17%.

Ensaio de VWF:GPIbM (Innovance® VWF Ac; Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Alemanha): o princípio do ensaio utiliza a ligação do FVW ao seu receptor GPIb. Partículas de poliestireno são revestidas com um anticorpo contra GPIb. GPIb recombinante (incluindo duas mutações de ganho de função) é adicionado e se liga ao anticorpo, bem como ao FVW da amostra. Devido às mutações de ganho de função, a ligação do FVW ao GPIb não requer ristocetina. Essa ligação do FVW induz aglutinação de partículas, que pode ser medida como aumento na extinção por medições turbidimétricas.

Amostra primária: plasma citratado.

Tabela 25. Reagentes (composição do kit) Innovance® VWF Ac

Innovance® VWF Ac	Ingredientes	Concentração	Origem
REAGENTE I	Tampão, sacarose, partículas de poliestireno revestidas com anticorpos monoclonais anti-GPIb, anfotericina B, gentamicina	2,2 g/L	Camundongo
REAGENTE II	Solução salina tamponada, reagente bloqueador heterofílico, detergente, polivinilpirrolidona, azida sódica	<1 g/L	
REAGENTE III	Solução salina tamponada, GPIb recombinante, anfotericina B, gentamicina	≤80 mg/L	

Preparação/procedimento:

- ✓ Os reagentes (RI, RII e RIII), o tampão imidazol e o calibrador são carregados no analisador.
- ✓ A curva padrão é executada.
- ✓ Após o término da calibração, a curva de calibração deve ser revisada e validada. A curva validada é a curva de calibração utilizada na determinação dos resultados.
- ✓ Analise a amostra de teste.

Calibração: uma curva padrão é gerada pela determinação automática de diferentes diluições de plasma humano padrão e tampão veronal de Owren. A curva padrão deve ser gerada novamente se houver alteração no instrumento ou no lote de Innovance® VWF Ac utilizado, ou se os resultados do controle estiverem fora da faixa aceitável. A calibração do ensaio é realizada com plasma humano padrão, calibrado em relação ao valor de VWF:RCo do padrão internacional para coagulação sanguínea (FVIII e FVW no plasma).

Amostras inicialmente acima da faixa de calibração são diluídas pelo instrumento, resultando em uma faixa de medição de até 600% do normal.

Controle de qualidade:

- ✓ Os controles (dois níveis) devem ser adquiridos separadamente
- ✓ Faixa normal: Plasma de controle N
- ✓ Faixa patológica: Plasma de controle P

Resultados:

- ✓ Os resultados são relatados como % de normalidade
- ✓ 100% = 1 UI/mL

Valores esperados: amostras de plasma recentes obtidas de doadores aparentemente saudáveis foram testadas por meio do ensaio Innovance® VWF Ac no Sistema BCS®/BCS® XP com os resultados (percentil 2,5 a 97,5) mostrados na Tabela 26.

Tabela 26. Valores esperados para o ensaio Innovance® VWF Ac

Grupo sanguíneo	Número de amostras testadas	% de normalidade
Todos	263	47,8 – 173,2
O	129	46,3 – 145,6
A+B+AB	134	61,4 – 179,1

Observação: recomenda-se que cada laboratório estabeleça suas próprias faixas normais de VWF:RCo, dependendo da população atendida e da técnica, método e equipamento utilizados.

Linearidade: 4 a 150%

Limite de detecção: 2,2%

Ensaio de VWF:Ab (HemosIL® Atividade do FVW, Instrumentation Laboratory, Bedford, MA, EUA): o kit de atividade do FVW é um ensaio imunoturbidimétrico com partículas de látex que quantifica a atividade do FVW no plasma. A atividade do FVW é determinada pela medição do aumento da turbidez produzido pela aglutinação do reagente de látex. Um anticorpo monoclonal anti-FVW específico adsorvido no reagente de látex, direcionado contra o sítio de ligação plaquetária do FVW (receptor GPIIb), reage com o FVW do plasma do paciente. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à atividade do FVW na amostra e é determinado pela medição da diminuição da luz transmitida causada pelos agregados.

Amostra primária: plasma citratado.

Reagentes (composição do kit):

- ✓ Reagente de látex: suspensão liofilizada de partículas de látex de poliestireno revestidas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-FVW purificado, direcionado contra um epítipo funcional do FVW, contendo albumina sérica bovina, estabilizantes e conservantes.
- ✓ Tampão: tampão tris contendo albumina sérica bovina, estabilizantes e conservantes.

Preparação:

- ✓ Tampão: pronto para uso
- ✓ Reagente de látex: dissolva o conteúdo de cada frasco despejando todo o conteúdo de um frasco de tampão em um frasco de reagente de látex. Recoloque a tampa e agite suavemente por no mínimo 20 segundos até dissolver completamente o látex liofilizado. Certifique-se da reconstituição completa do produto. Ele deve se apresentar na forma de suspensão homogênea e levemente leitosa. Mantenha o reagente a 15–25°C por 30 minutos e inverta para misturar antes de usar. Não agite. Observação: Evite a formação de espuma ao homogeneizar os reagentes reconstituídos. Bolhas na superfície dos líquidos podem interferir nos sensores de líquido do instrumento.

Controle de qualidade: plasma de calibração, controles normal e anormal (adquiridos separadamente) são recomendados para um programa completo de controle de qualidade. Controle Normal e Controle de Teste Especial Nível 1 são projetados para este programa. Cada laboratório deve estabelecer sua própria média e desvio padrão.

Resultados: os resultados da atividade do FVW são relatados em % de normalidade.

Tabela 27. Valores esperados para o ensaio de VWF:Ab HemosIL® Atividade do FWW

Grupo sanguíneo	Número de amostras testadas	% de atividade do FWW
O	132	40,3 – 125,9
A+B+AB	134	48,8 – 163,4

Observação: em razão das inúmeras variáveis que podem afetar os resultados, cada laboratório deve estabelecer sua própria faixa normal para a atividade do FWW.

- ✓ Linearidade: 19–130%
- ✓ Limite de detecção: 3,2%

Antígeno de Von Willebrand (VWF:Ag): o ensaio de VWF:Ag é um ensaio quantitativo que mede a quantidade total de proteína FWW presente na amostra, que inclui formas funcionais e disfuncionais. Os níveis de VWF:Ag podem ser quantificados por métodos imunológicos que incluem ELISA, imunoensaio de látex (LIA) automatizado e, mais recentemente, imunoensaio quimioluminescente (CLIA). Os ensaios de VWF:Ag são geralmente muito confiáveis e reproduzíveis. O limite inferior de detecção varia entre os ensaios, com o LIA tendendo a ter um limite ligeiramente mais alto e os ensaios CLIA com o menor limite de detecção. O VWF:Ag é um teste essencial no diagnóstico de DVW, mas é limitado, pois avalia apenas a presença de FWW e não avalia sua função. Usado isoladamente, o VWF:Ag só consegue identificar a DVW tipo 3 quando há níveis indetectáveis de VWF:Ag, geralmente inferiores a 3 UI/dL. De acordo com as diretrizes da *British Society for Haematology* (BSH) [Sociedade Britânica de Hematologia] e da *United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation* (UKHCDO) [Organização de Médicos de Centros de Hemofilia no Reino Unido], o diagnóstico de DVW tipo 3 requer um ensaio de VWF:Ag capaz de medir níveis <1 UI/dL. Outros ensaios funcionais ou de atividade do FWW com cálculo das razões entre atividade e antígeno do FWW são necessários para o diagnóstico e a diferenciação de DVW tipo 1 e tipo 2. A faixa normal do valor de VWF:Ag varia de acordo com o laboratório, mas é geralmente aceita entre 50 e 200 UI/dL. Níveis abaixo de 50 UI/dL são considerados baixos, embora precisem ser correlacionados com o histórico de sangramento e outros ensaios de atividade do FWW para o diagnóstico de DVW. Sabe-se que indivíduos com tipo sanguíneo O apresentam redução de 25% nos níveis de FWW em comparação com indivíduos do grupo sanguíneo não O e, portanto, têm maior probabilidade de serem diagnosticados com DVW tipo 1. No entanto, o fenótipo de sangramento de indivíduos com DVW é semelhante, independentemente do grupo sanguíneo. Portanto, faixas de referência específicas para ABO não são necessárias. O protocolo para o ensaio ELISA de VWF:Ag por ELISA, LIA e CLIA está listado abaixo.

Antígeno de Von Willebrand (VWF:Ag) por ELISA: ensaio ELISA para a determinação quantitativa de antígeno do FWW (VWF:Ag) em plasma humano citratado. Um poço de microtitulação é revestido com um anticorpo (anticorpo de captura) específico contra FWW. Diluições de plasma de teste e padrão são adicionadas e incubadas, durante as quais o FWW se liga ao anticorpo de captura na placa. Após a lavagem, um segundo anticorpo anti-FWW marcado com enzima (anticorpo de detecção) é adicionado e se liga ao FWW ligado à placa. A quantidade de anticorpo ligado e, portanto, de FWW presente na amostra, é quantificada pela adição de substrato enzimático seguido pelo desenvolvimento de cor. Amostra primária: 3,2% de sangue citratado.

Materiais e Reagentes:

- ✓ Placa de microtitulação
- ✓ Anticorpo de captura/revestimento: Anticorpo policlonal de coelho anti-FWW humano (Dako, código n° 0082)
- ✓ Anticorpo de detecção/marcação: Anticorpo policlonal de coelho anti-FWW humano/HRP (Dako, código n° 0226)
- ✓ Tampão de revestimento de bicarbonato
- ✓ Tampão de diluição
- ✓ Tampão de lavagem
- ✓ Tampão de substrato
- ✓ Substrato: dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) (Sigma P8287)
- ✓ H₂SO₄ 1,5 M
- ✓ Calibrador: PNP ou plasma comercial padrão
- ✓ PPP citratado de paciente

- ✓ Plasma de controle normal e anormal
- ✓ Peróxido de hidrogênio a 30%
- ✓ Lavadora e leitor de placas ELISA
- ✓ Pipetas e ponteiros
- ✓ Banho-maria a 37°C
- ✓ Seladores de placas
- ✓ Misturador vortex

Preparação dos reagentes:

Tampão de revestimento de bicarbonato:

- a. Carbonato de sódio (Na_2CO_3): 0,16 g
- b. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3): 0,294 g
- c. Dissolva em água destilada e complete o volume até 100 mL. Ajuste o pH para 9,6.
- d. Adicione aproximadamente 100 μL de corante vermelho. Prazo de validade de 2-3 semanas.

Tampão estoque concentrado:

- a. Dihidrogenofosfato de sódio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$): 0,975 g
- b. Hidrogenofosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): 6,7 g
- c. Cloreto de sódio (NaCl): 70,55 g

Dissolva em água destilada, misture bem com agitador magnético em balão volumétrico de fundo plano e, por fim, complete o volume até 250 mL.

Tampão de lavagem: dilua o tampão estoque concentrado 1:10 (ou seja, 100 mL de tampão estoque concentrado para 900 mL de água destilada). Adicione 2 mL de Tween 20. Misture bem e armazene a 4°C. Prazo de validade de 2 semanas.

Tampão de marcação e diluição: dissolva 3 gramas de PEG em 100 mL de tampão de lavagem com alto teor de sal. Adicione 100 μL de corante verde. Prazo de validade de 2 semanas.

Tampão de substrato: dissolva 0,73 g de ácido cítrico e 2,4 g de hidrogenofosfato dissódico em água destilada e complete o volume até 100 mL. Ajuste o pH para 5,0. Prazo de validade de 2 meses.

Ácido sulfúrico 1,5 M: adicione 16,5 mL de ácido sulfúrico concentrado a 180 mL de água. Sempre adicione o ácido à água.

Procedimento:

Revestimento das placas: as placas devem ser revestidas no dia anterior ao que forem utilizadas. As placas podem ser revestidas 16-96 horas antes do uso. Dilua o anticorpo de revestimento 1:1000 em tampão COAT, ou seja, 12 μL em 12 mL de tampão COAT. Misture delicadamente e adicione 100 μL a cada poço. Sele com plástico e incube a 40°C durante a noite.

Procedimentos do ensaio: prepare diluições para a curva padrão, conforme mostrado:

- ✓ Para preparar a solução estoque: dilua 50 μL do pool de plasma normal em 3,95 mL de tampão de diluição (1,80). Prepare uma série de padrões a partir desse estoque, conforme mostrado abaixo:
 - a. Solução estoque 125% (S1)
 - b. 0,8 mL de estoque + 0,2 mL de tampão 100% (S2)
 - c. 0,6 mL de estoque + 0,4 mL de tampão 75% (S3)
 - d. 0,4 mL de estoque + 0,6 mL de tampão 50% (S4)
 - e. 0,2 mL de estoque + 0,8 mL de tampão 25% (S5)
 - f. 0,1 mL de estoque + 0,9 mL de tampão 12,5% (S6)

- g. 0,05% de estoque + 0,95 mL de tampão 6,25% (S7)
- h. 1,00 mL de branco de tampão

- ✓ Dilua amostras de paciente e controle em 2 diluições, 1:100 e 1:200, em tampão de diluição (ou seja, 10 µL em 990 µL e 500 µL de tampão diluído 1:100 + 500 µL).
- ✓ Lave três vezes com tampão de lavagem utilizando a lavadora de placas, deixando um intervalo de imersão de três minutos entre cada lavagem. Após a última aspiração, retire o excesso de líquido e verifique se não há bolhas.
- ✓ Adicione 100 µL de padrões, testes e brancos, em duplicata, aos poços da placa revestida utilizando o seguinte formato:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
B	S2	S2	T1	T1	T5	T5	T9	T9	T13	T13	T17	T17
C	S3	S3	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
D	S4	S4	T2	T2	T6	T6	T10	T10	T14	T14	T18	T18
E	S5	S5	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
F	S6	S6	T3	T3	T7	T7	T11	T11	T15	T15	Q1	Q1
G	S7	S7	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2
H	BK	BK	T4	T4	T8	T8	T12	T12	T16	T16	Q2	Q2

S1-S7 - diluições do padrão; T – plasma de teste; BK - branco

- ✓ Cubra com selante de placa. Incube por 1 hora em banho-maria a 37°C.
- ✓ Lave três vezes com tampão de lavagem utilizando a lavadora de placas, deixando um intervalo de imersão de três minutos entre cada lavagem. Após a última aspiração, retire o excesso de líquido e verifique se não há bolhas.
- ✓ Dilua o anticorpo de detecção/marcação de FWW 1:4000 (ou seja, 5 µL em 20 mL de tampão de marcação).
- ✓ Misture delicadamente e adicione 100 µL de anticorpo de marcação diluído a cada poço. Cubra com selante de placa. Incube por 1 hora em banho-maria a 37°C.
- ✓ Lave três vezes com tampão de lavagem utilizando a lavadora de placas, deixando um intervalo de imersão de três minutos entre cada lavagem. Após a última aspiração, retire o excesso de líquido e verifique se não há bolhas.
- ✓ Durante a lavagem, prepare a solução de substrato da seguinte forma: dissolva um comprimido de OPD de 10 mg em 15 mL de tampão de substrato. Deixe a solução preparada atingir a temperatura ambiente. Imediatamente antes do uso, adicione 7 µL de peróxido de hidrogênio a 30%.
- ✓ Usando um cronômetro, adicione 100 µL da solução de substrato a cada poço. Incube por 8-10 minutos em bancada.
- ✓ Interrompa a reação adicionando 100 µL de H₂SO₄ 1,5 M a cada poço EXATAMENTE no mesmo intervalo de tempo em que o substrato foi adicionado. Agite a placa para misturar.
- ✓ Selecione o programa apropriado (492 nm) no leitor de placas Lab Systems e trace a curva de calibração usando papel milimetrado linear. As placas devem ser lidas em até 30 minutos após a conclusão. Se houver atraso, armazene as placas em um armário escuro por até 4 horas.
- ✓ Para calcular os resultados: leia a diluição 1:100 diretamente da calibração, multiplique a diluição 1:200 por dois e calcule a média dos resultados. Inclua apenas os resultados que se enquadrarem na curva padrão.

Protocolo de controle de qualidade: analise o controle normal e o controle anormal (nível baixo) juntamente com cada lote. Se disponível, inclua uma amostra de DWW tipo 3 como controle.

Interpretação dos resultados: os resultados são relatados como % ou UI/dL.

Antígeno de Von Willebrand por LIA automatizado: LIA automatizado é usado para a determinação quantitativa de antígeno do FWW (VWF:Ag) em plasma humano citratado. Esse é o método mais comumente utilizado para estimar os níveis de VWF:Ag. O kit de VWF:Ag automatizado é um ensaio imunoturbidométrico com partículas de látex que quantifica VWF:Ag no plasma. Quando o plasma contendo VWF:Ag é misturado com o reagente de látex e o tampão de reação incluídos no kit, as partículas de látex revestidas se aglutinam. O grau de aglutinação é diretamente proporcional à concentração de

VWF:Ag na amostra e é determinado pela medição da diminuição da luz transmitida causada pelos agregados. Existem vários kits de ensaio de VWF:Ag baseados em LIA disponíveis comercialmente. O protocolo abaixo é para o kit HemosIL VWF:Ag da Instrumentation Laboratories, mas outros ensaios também podem ser usados. A inclusão desse método não constitui endosso do produto de uma empresa específica. Caso use uma fonte comercial diferente, é importante seguir as instruções do fabricante.

Reagentes e Materiais:

- ✓ Reagente de látex: 2 frascos de 3 mL de suspensão de partículas de látex de poliestireno revestidas com anticorpo policlonal de coelho direcionado contra FVV, contendo albumina sérica bovina, tampão, estabilizante e conservante
- ✓ Tampão de reação: 2 frascos de 4 mL de tampão HEPES contendo albumina sérica bovina, estabilizantes e conservantes
- ✓ Diluente de fator (tampão imidazol)
- ✓ Plasma calibrador (1 litro de plasma calibrador)
- ✓ PPP citratado de paciente
- ✓ Plasma de controle normal e anormal (nível baixo)
- ✓ Água destilada para reconstituição dos reagentes

Preparação dos reagentes, armazenamento e estabilidade dos reagentes:

- ✓ Reconstitua o plasma calibrador com exatamente 1 mL de água destilada. Deixe o material reconstituído em temperatura ambiente (18–25°C) por 30 minutos. Em seguida, agite o frasco suavemente antes de usar. A preparação permanece estável por 8 horas a 15–25°C. Pode ser congelada e armazenada a -80°C ou menos.
- ✓ Plasma de controle anormal (Dade P): reconstitua o controle P com exatamente 1 mL de água destilada ou deionizada. Agite cuidadosamente para dissolver sem formação de espuma e deixe em temperatura ambiente (18–25°C) por 15 minutos. Antes de usar, agite novamente com cuidado.
- ✓ Controle normal/pool de plasma normal: Mantenha o PNP em banho-maria a 37°C por 5 minutos, misture delicadamente antes de usar.
- ✓ Reagente de látex: adicione 2 mL de tampão de reação e misture bem sem bolhas de ar. Após aberto, permanece estável por 3 meses a 2–8°C no frasco original ou por 1 semana a 15°C no ACL Top Family. Não congele.
- ✓ Tampão de reação: após aberto, permanece estável por 3 meses a 2–8°C no frasco original ou por 1 semana a 15°C no ACL Top Family. Não congele.

Detalhes da calibração: carregue os reagentes apropriados (látex de VWF:Ag, tampão de VWF:Ag, calibrador e diluente de fator) no analisador automático. Selecione o programa de calibração e execute-o. Assim que a calibração for concluída, analise os resultados. Se não houver erros/falhas e a calibração for aceitável, valide a curva de calibração. A calibração é realizada quando há alteração nos números de lote dos reagentes ou nos principais componentes do instrumento, conforme as exigências regulatórias locais ou a critério do laboratório.

Protocolo de controle de qualidade: execute pelo menos dois níveis de controle (controle normal e controle anormal) junto com cada execução. Cada laboratório deve estabelecer sua própria média e desvio padrão, além de estabelecer um programa de controle de qualidade.

Procedimento: selecione o programa apropriado no instrumento e mantenha os reagentes necessários (látex de VWF:Ag, tampão de VWF:Ag e diluente de fator). Carregue as amostras e execute conforme as instruções do fabricante.

Resultados: os resultados são relatados em % ou UI/dL.

Faixa normal:

- ✓ Grupo sanguíneo O: 42,0–140,8 UI/dL
- ✓ Grupos sanguíneos A, B e AB: 66,1–176,3 UI/dL

Limite de detecção:

- ✓ ACL Family: 3,5 UI/dL
- ✓ ACL Top Family/ACL Top Family 5 series: 2,2 UI/dL

Linearidade:

- ✓ ACL Family: 10–150 IU/dL
- ✓ ACL Top Family/ACL Top Family 5 series: 8,5–250 IU/dL
- ✓ Se a faixa linear for excedida, as amostras devem ser diluídas 1:4 com diluente de fator (100 µL de amostra + 300 µL de diluente). Diluições adicionais até 1:16 podem ser realizadas, se necessário. Multiplique os resultados pelo respectivo fator de diluição.

Antígeno de Von Willebrand por CLIA automatizado: CLIA automatizado é usado para a determinação quantitativa de VWF:Ag em plasma humano citratado. O ensaio CLIA de VWF:Ag é um imunoensaio de duas etapas que quantifica VWF:Ag em plasma humano citratado, utilizando esferas magnéticas como fase sólida e um sistema de detecção quimioluminescente. Na primeira etapa, a amostra é misturada com partículas magnéticas revestidas com anticorpo policlonal anti-FVW e tampão de ensaio. O FVW presente na amostra liga-se às partículas magnéticas revestidas com anti-FVW. Na segunda etapa, após separação magnética e lavagem, adiciona-se um anticorpo policlonal anti-FVW marcado com isoluminol. A reação quimioluminescente é medida em unidades relativas de luz, que são diretamente proporcionais à concentração de VWF:Ag na amostra. Estudos com dados de EQA demonstraram que o método CLIA de VWF:Ag tem o menor CV e o menor limite de detecção. Atualmente, o VWF:Ag pelo método CLIA é oferecido apenas pelo HemosIL Acustar VWF:Ag e pode ser executado apenas no instrumento ACL Acustar.

Composição dos reagentes:

O kit de VWF:Ag é composto por:

- a. Cartucho de VWF:Ag para 25 determinações: cada cartucho contém 1 frasco de suspensão de partículas magnéticas liofilizadas revestidas com anticorpo policlonal de coelho anti-FVW, 1 frasco de tampão de ensaio, 1 frasco de marcador consistindo em anticorpo policlonal de coelho anti-FVW marcado com isoluminol e 1 frasco de diluente de amostra. Os reagentes estão em tampão fosfato contendo albumina sérica bovina, IgG policlonal de coelho, estabilizantes e conservantes.
- b. Calibrador 1 de VWF:Ag: contém solução salina com conservantes.
- c. Calibrador 2 de VWF:Ag: 2 frascos de plasma humano liofilizado contendo tampão, estabilizantes e conservantes.

Preparação e procedimento:

Cartucho de VWF:Ag: na primeira vez que o cartucho for usado, inverta-o suavemente 30 vezes, evitando a formação de espuma, e verifique a ressuspensão completa do frasco de micropartículas. Se as micropartículas não estiverem totalmente suspensas, continue invertendo o cartucho até que esteja completamente ressuspensas. Siga as instruções fornecidas para abrir o cartucho e carregá-lo no Sistema ACL AcuStar.

Calibrador 1 de VWF:Ag: é líquido e deve ser misturado por inversão suave várias vezes antes do uso para garantir a homogeneidade do calibrador.

Calibrador 2 de VWF:Ag: dissolva o conteúdo do frasco com 1 mL de água do tipo reagente de laboratório clínico (CLR) ou equivalente. Recoloque a tampa e agite suavemente. Certifique-se da reconstituição completa do produto. Mantenha o calibrador a 15–25°C por 30 minutos e inverta-o suavemente para misturar antes do uso. Não agite. Após a reconstituição, despeje todo o conteúdo do frasco do calibrador no tubo plástico vazio, devidamente rotulado e com código de barras, para uso no Sistema ACL AcuStar.

Armazenamento e estabilidade dos reagentes:

Reagentes e calibradores fechados permanecem estáveis até a data de validade impressa no cartucho e nos rótulos dos frascos, quando armazenados a 2-8°C.

Cartucho de VWF:Ag: a estabilidade após aberto a 2-8°C no ACL AcuStar é de 8 semanas. Os cartuchos abertos devem permanecer no ACL AcuStar.

Calibradores 1 e 2 de VWF:Ag: a estabilidade após abertura e/ou reconstituição no ACL AcuStar é de 4 horas. Para estabilidade ideal, remova os calibradores do sistema e armazene-os a 2-8°C em tubos plásticos com código de barras tampados.

Protocolo de controle de qualidade: execute pelo menos dois níveis de controle (controle normal e controle anormal) junto com cada execução. Cada laboratório deve estabelecer sua própria média e desvio padrão, além de estabelecer um programa de controle de qualidade.

Procedimento: selecione o programa apropriado no instrumento e mantenha os reagentes necessários. Carregue as amostras e execute conforme as instruções do fabricante.

Resultados: os resultados são relatados em % ou UI/dL.

Faixa normal:

Todos os grupos sanguíneos: 52,2–177,9 UI/dL

Grupo sanguíneo O: 48,2–157,2 UI/dL

Grupos sanguíneos A, B e AB: 59,6–210,5 UI/dL

Limite de detecção:

ACL AcuStar: 0,13 IU/dL

Linearidade:

ACL Family: 0,3–400 IU/dL

Quando a função de repetição do instrumento é ativada, o instrumento realiza uma diluição automática e corrige o resultado final para o fator de diluição (20x), expandindo assim a faixa para 8000 UI/dL. O ensaio não é afetado pelo efeito prozona.

Ensaio de Ligação do Fator de Von Willebrand ao Colágeno (VWF:CB): o FVW é uma proteína plasmática com diversas funções e atividades. O FVW age como uma ponte adesiva entre as plaquetas e a parede dos vasos. Liga-se às plaquetas, principalmente por meio do receptor GPIb, utilizando seu domínio A1, e ao colágeno subendotelial, principalmente por meio do domínio A3, promovendo a adesão plaquetária. A capacidade de ligação plaquetária do FVW pode ser avaliada utilizando o ensaio do cofator de ristocetina (VWF:RCo) ou outros ensaios de ligação do GPIb mais recentes, sendo o ensaio de atividade do FVW mais comumente utilizado. Porém, VWF:RCo e VWF:CB avaliam diferentes funções do FVW. VWF:CB depende da capacidade do FVW de aderir ao colágeno e é dependente da presença de multímeros de alto peso molecular (HMW) e um sítio de ligação ao colágeno intacto. O colágeno tem baixa afinidade por domínios de ligação do FVW únicos e requer FVW multimérico grande para associação estreita com o colágeno. Essa propriedade do VWF:CB é utilizada para detectar perda de multímeros de HMW, o que pode diferenciar entre o tipo 2A/2B (perda de multímeros de HMW) e o tipo 2M (distribuição de multímeros normais). As recentes diretrizes sobre DVW de 2021 sugerem o uso de análise de multímeros ou VWF:CB para discriminar DVW tipo 2M do tipo 2A/2B. VWF:CB é mais comumente realizado usando um método baseado em ELISA. Diversos ensaios ELISA comerciais estão disponíveis no mercado. Deve-se ter cuidado ao escolher o ensaio otimizado para detectar preferivelmente FVW de HMW. Mais recentemente,

ele também pode ser realizado no analisador automatizado Acustar, que utiliza um CLIA. O ensaio de VWF:CB Acustar é um imunoensaio de duas etapas, no qual partículas magnéticas atuam como fase sólida e são revestidas com peptídeo de tripla hélice de colágeno tipo III. O FWW presente na amostra liga-se às partículas magnéticas proporcionalmente à sua capacidade de ligação ao colágeno, medida por um sistema de detecção quimioluminescente.

Aqui, descrevemos um método interno baseado em ELISA para VWF:CB: esse ensaio testa a capacidade do FWW derivado de plasma de paciente de se ligar ao colágeno previamente revestido em placas de microtitulação de 96 poços. O FWW adsorvido ao colágeno imobilizado é detectado por um anticorpo policlonal marcado com enzima e subsequente reação de substrato, que é monitorada fotometricamente com um leitor de ELISA. É melhor usar uma mistura de ~95% de colágeno tipo I (ligação fraca ao FWW) e ~5% de colágeno tipo III (boa ligação ao FWW) para obter boa seletividade para FWW de HMW. Alternativamente, uma concentração menor de colágeno tipo III (1–5 µg/mL) também pode ser usada. Níveis reduzidos de VWF:CBA estarão presentes em indivíduos com defeitos quantitativos ou qualitativos. Como esse ensaio isoladamente não permitirá a classificação da DWW, é importante que esse ensaio funcional seja realizado em conjunto com o ensaio de VWF:Ag e VWF:RCo.

Amostra primária: sangue citratado.

Materiais e reagentes:

- ✓ Colágeno com uma mistura de ~95% de colágeno tipo I/~5% de colágeno tipo III (Horm Collagen, colágeno ICN)
- ✓ Tampão de diluição e tampão de lavagem (PBS com Tween 20)
- ✓ Tampão de substrato: tampão acetato de sódio/ácido cítrico 0,1 M
- ✓ Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30%
- ✓ Anticorpo policlonal de coelho anti-FWW humano conjugado com HRP (Dako)
- ✓ Placas de microtitulação EIA de 96 poços
- ✓ PPP citratado de paciente, PNP e plasma de controle anormal
- ✓ H_2SO_4 2 M
- ✓ Substrato: dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD)

Preparação dos reagentes:

PBS (pH 7,4) com Tween 20:

- a. Cloreto de sódio (NaCl): 8,0 g
- b. Cloreto de potássio (KCl): 0,20 g
- c. Hidrogenofosfato dissódico ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$): 2,90 g
- d. Dihidrogenofosfato de potássio ($KH_2PO_4 \cdot H_2O$): 0,20 g
- e. Complete o volume até 1,0 L e ajuste o pH para 7,4. Adicione 500 µL de Tween 20.

Tampão de substrato:

Tampão acetato de sódio/ácido cítrico 0,1 M

Dissolva 13,6 g de acetato de sódio em 100 mL de água destilada e ajuste o pH para 6,0 usando ácido cítrico 1 M (52,14 g por 250 mL de água destilada).

H_2SO_4 2 M:

Adicione 10,65 mL de H_2SO_4 concentrado a 89,35 mL de água destilada.

Procedimento:

- ✓ Revista as placas de ELISA com colágeno. Misture delicadamente o colágeno por inversão antes do uso. Dilua 200 µL de colágeno estoque em 20 mL de PBS, misture bem e, em seguida, adicione 200 µL a cada poço. Sele e mantenha em caixa úmida por 24-48 horas.
- ✓ Lave a placa com PBS três vezes (intervalo de três minutos para cada lavagem). Retire o excesso de tampão e verifique se não há bolhas de ar.
- ✓ Faça uma pré-diluição 1:10 de cada amostra de teste (ou seja, adicione 20 µL de amostra a 180 µL de PBS nos tubos de ensaio). Inclua também os controles na execução.
- ✓ A curva de calibração é executada de 400% a 0%. Identifique os tubos de A a H. Coloque 180 µL de tampão em um tubo de ensaio e adicione 120 µL de PNP (tubo A). Adicione 150 µL de tampão dos tubos B a G. Dilua os tubos em série, retirando 150 µL do tubo A para o tubo B e até o tubo G.
- ✓ O tubo H serve como branco. Adicione apenas 200 µL de tampão.
- ✓ Adicione 180 µL de tampão em todos os poços após lavar as placas revestidas de colágeno três vezes (conforme descrito na etapa 2).
- ✓ Adicione 20 µL de padrão diluído em série de A a G.
- ✓ Adicione 20 µL de amostra pré-diluída e controles em triplicata.
- ✓ Sele e incube a 22°C (temperatura ambiente em caixa úmida) por 2 horas.
- ✓ Lave a placa três vezes com PBS e adicione anticorpo conjugado com peroxidase pré-diluído (diluição 1:1000, ou seja, 22 µL de anticorpo HRP-TAG anti-FVW para 22 mL de PBS). Adicione 200 µL a cada poço.
- ✓ Incube por 2 horas em temperatura ambiente.
- ✓ Lave a placa três vezes com PBS.
- ✓ Adicione 200 µL de substrato. Para isso, dissolva um comprimido de OPD 10 mg em 22,5 mL de água destilada e 2,5 mL de tampão de substrato estoque. Adicione 15,0 µL de H₂O₂ a 30% ao substrato imediatamente antes do uso.
- ✓ Aguarde 15-20 minutos para o desenvolvimento de cor e adicione 50 µL de H₂SO₄ 2M para interromper a reação. Faça a leitura em um leitor de ELISA com filtro de comprimento de onda de 492 nm.

Protocolo de controle de qualidade: analise o controle normal (PNP) e o controle anormal de nível baixo (Dade P) em cada execução. Se disponível, também pode ser incluída uma amostra de paciente sabidamente com DVW. Limite de detecção: 0–400%.

Interpretação dos resultados: VWF:CB permite o diagnóstico mais exato de DVW e reduz erros de classificação e possíveis diagnósticos omitidos. Estudos demonstraram que as taxas de erro diagnóstico de DVW são reduzidas em 50% com a adição de VWF:CB a um painel de quatro testes (ou seja, FVIII, ensaios baseados em VWF:RCo ou GPIb, VWF:Ag, e VWF:CB) em comparação com o painel de três testes mais comumente utilizado (FVIII, ensaios baseados em VWF:RCo ou GPIb, e VWF:Ag).

- ✓ DVW tipo 1 versus tipo 2: a DVW tipo 1 apresenta níveis reduzidos de VWF:Ag sem discrepância entre os ensaios de atividade e antígeno. Portanto, a relação VWF:CB/VWF:Ag e a relação VWF:RCo/VWF:Ag estão normais. Uma relação de 0,6 ou 0,7 pode ser usada para determinar a discrepância entre os vários ensaios de atividade e antígeno do FVW. Estudos demonstraram que VWF:CB consegue diferenciar o tipo 1 do tipo 2A/2B melhor do que o ensaio de VWF:RCo.
- ✓ DVW tipo 2A/2B versus 2M: VWF:CB pode ser usado como substituto na análise de multímeros para diferenciar entre DVW tipo 2A/2B e 2M, de acordo com as diretrizes mais recentes de 2021 para DVW. A relação VWF:CB/VWF:Ag reduzida sugere perda de multímeros de HMW, que pode ser observada na DVW tipo 2A e 2B. Esses pacientes também terão a relação VWF:RCo/VWF:Ag reduzida. DVW tipo 2M apresentará relação VWF:CB/VWF:Ag normal, mas terá relação VWF:RCo/VWF:Ag reduzida. Um subconjunto do tipo 2M com defeito no sítio de ligação ao colágeno pode apresentar relação VWF:CB/VWF:Ag normal. Embora o VWF:CB baseado em CLIA possa discriminar com exatidão a DVW tipo 1 do tipo 2, tem menos utilidade para discriminar a DVW tipo 2M da DVW tipo 2A com base em estudos preliminares. Mais estudos são necessários para confirmar esses achados. VWF:CB baseado em ELISA otimizado deve ser utilizado para esse fim.

- ✓ DWV tipo 3 versus DVW tipo 1 grave: VWF:CB possui limite inferior de detecção melhor do que VWF:RCo. VWF:CB consegue detectar melhor a ausência de FVW na DVW tipo 3 e a presença de níveis muito baixos de FVW na DVW tipo 1 grave.
- ✓ VWF:CB é uma ferramenta importante no diagnóstico de DVW. Porém, um ensaio de ligação ao colágeno apropriado e otimizado deve ser utilizado. A origem e a concentração de colágeno podem afetar os resultados. Quando ensaios internos forem utilizados, é melhor usar uma mistura de tipo I/III (~95%/~5%) ou então colágeno tipo III em baixas concentrações. Custo-efetividade: VWF:CB pode ser realizado por ensaios baseados em ELISA internos, o que o torna um ensaio de atividade de FVW custo-efetivo. Em combinação com um ensaio ELISA de VWF:Ag interno, propicia um método barato e eficiente para identificar subtipos de DVW (exceto DVW tipo 2M e tipo 2N) em um cenário com recursos limitados.

Ensaio de Ligação ao Fator VIII para Diagnóstico de Doença de Von Willebrand Normandy: a variante Normandy (DVW tipo 2N) da DVW é uma doença autossômica recessiva rara, identificada pela primeira vez em 1989. A doença é caracterizada por um defeito no FVW que resulta em capacidade reduzida de ligação ao FVIII, levando ao aumento do clearance de FVIII não ligado da circulação. As manifestações clínicas e laboratoriais de pacientes com tipo 2N podem se assemelhar às de pacientes com hemofilia A leve/moderada ou portadores de hemofilia A. É provável que alguns pacientes com tipo 2N sejam diagnosticados erroneamente, a menos que um ensaio de ligação ao FVIII (VWF:FVIIIb) seja realizado para confirmação. A distinção é importante, pois a terapia de reposição com FVW purificado será muito mais eficaz do que a reposição de FVIII nesses pacientes. Os padrões de herança das duas doenças também são bastante diferentes — autossômico recessivo na DVW tipo 2N e recessivo ligado ao X na hemofilia A. Pacientes com tipo 2N são homozigotos (mesmas mutações do tipo 2N) ou heterozigotos compostos (duas mutações do tipo 2N diferentes ou uma combinação de mutações de DVW 2N e outro tipo). Mutações são comumente observadas no domínio D'D3 do FVW. Os níveis de FVIII são leve a moderadamente reduzidos, geralmente na faixa de 5 a 40 UI/dL. Os níveis de FVIII para VWF:Ag são reduzidos, geralmente <0,7. Os parâmetros de FVW (VWF:Ag, VWF:RCo, VWF:CB e análise de múltiplos) são geralmente normais, a menos que haja heterozigose composta para outras mutações de DVW. Esses últimos pacientes tendem a ser mais sintomáticos. Heterozigotos para o tipo 2N são geralmente assintomáticos e apresentam níveis normais ou apenas levemente reduzidos de FVIII. Dois ensaios internos foram descritos para VWF:FVIIIb (Nesbitt et al, 1996; e Casonato et al, 1998). Ambos os ensaios exibem boa concordância e diferem com base na detecção do ponto final de FVIII residual. Nos dois ensaios, a placa de microtitulação é revestida com anticorpo contra FVW. O complexo FVW-FVIII na amostra de paciente é imobilizado na placa e o FVIII endógeno é removido com cloreto de cálcio. Uma preparação recombinante de FVIII (rFVIII) puro na concentração de 100 UI/dL é adicionada. A quantidade de rFVIII ligado ao FVW imobilizado é medida por ensaio cromogênico (Nesbitt et al, 1996) ou usando anticorpo policlonal anti-FVIII conjugado (Casonato et al, 1998). Apenas um ensaio de ligação ao FVIII comercial está disponível (Asserachrom:FVIIIb, Diagnostica Stago). Aqui, descrevemos o método baseado em ELISA interno semelhante ao descrito por Casonato et al (1998).

Amostra primária: sangue citratado.

Materiais e reagentes:

- ✓ Anticorpo de revestimento: anticorpo policlonal de coelho anti-FVW humano (Dako)
- ✓ Anticorpo primário: IgG purificada de ovelha anti-FVIII humano, 10 mg/mL
- ✓ Anticorpo de marcação: anticorpo de burro anti-IgG de ovelha AffiniPure conjugado com peroxidase (Jackson Immunoresearch)

Como alternativa, se disponível, anticorpo anti-FVIII conjugado com HRP pode ser usado diretamente em substituição ao anticorpo primário e ao anticorpo de marcação.

- ✓ Cloreto de cálcio 0,4 M
- ✓ Tampão de revestimento de bicarbonato
- ✓ Tampão TBS e tampão de diluição
- ✓ Tampão de lavagem
- ✓ Tampão de substrato
- ✓ Substrato: dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD)

- ✓ Ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M
- ✓ Ácido clorídrico
- ✓ Concentrado de FVIII (recombinado)
- ✓ Plasma de teste citratado pobre em plaquetas
- ✓ Pool de plasma normal, controles

Preparação dos reagentes:

Tampão de revestimento de bicarbonato:

- a. Carbonato de sódio (Na_2CO_3): 0,16 g
- b. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3): 0,294 g
- c. Complete o volume até 100 mL. Ajuste o pH para 9,6. Prazo de validade de 2-3 semanas.
- d. Adicione aproximadamente 200 µL de corante vermelho.

Prepare tampão TBS 150 mM conforme indicado:

- a. Cloreto de sódio, NaCl: 11,68 g
- b. Base TRIZMA: 12,12 g
- c. Dissolva em 1800 mL de água. Complete o volume até 2000 mL. Ajuste o pH para 7,4 com ácido clorídrico.

Tampão de diluição: dissolva 1 g de albumina sérica bovina (BSA) em 100 mL de tampão TBS e Tween 20 a 0,2%. São necessários cerca de 100 mL por placa.

Tampão de lavagem: adicione Tween 20 a 0,2% ao TBS. Adicione 2 mL de Tween 20 a 1000 mL de TBS.

Cloreto de cálcio 0,4 M: dissolva 0,588 g de CaCl_2 em 10 mL de tampão de diluição.

Tampão de substrato:

- a. Ácido cítrico. H_2O : 0,73 g
- b. Hidrogenofosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$): 2,4 g
- c. Complete o volume até 100 mL com água destilada. Ajuste o pH para 5,0. Prazo de validade de 2 meses.

Substrato: dissolva um comprimido de OPD de 10 mg em 15 mL de tampão de substrato.

Ácido sulfúrico 2 M: adicione 10,65 mL de H_2SO_4 concentrado a 89,35 mL de água destilada.

Concentrado de FVIII (recombinado) diluído: reconstitua o recombinado em 1 mL de água deionizada e divida em alíquotas de 500 µL em frascos e armazene congelado a -80°C .

Procedimento:

Revestimento das placas:

- ✓ Dilua o anticorpo de revestimento 1:1000
- ✓ Adicione 100 mL/poço. Incube a 4°C durante a noite. As placas podem ser revestidas 16-96 horas antes do uso.

Diluição dos padrões:

- ✓ Para preparar a solução estoque, dilua 50 µL de PNP em 3,95 mL de tampão de diluição (1:80).
- ✓ Prepare uma série de padrões a partir deste estoque.

- | | |
|---|-----------|
| a. Solução estoque | 125% (S1) |
| b. 0,8 mL de estoque + 0,2 mL de tampão | 100% (S2) |
| c. 0,6 mL de estoque + 0,4 mL de tampão | 75% (S3) |

- | | | |
|----|--|------------|
| d. | 0,4 mL de estoque + 0,6 mL de tampão | 50% (S4) |
| e. | 0,2 mL de estoque + 0,8 mL de tampão | 25% (S5) |
| f. | 0,1 mL de estoque + 0,9 mL de tampão | 12,5% (S6) |
| g. | 0,05 mL de estoque + 0,95 mL de tampão | 0,25% (S7) |
| h. | 1,00 mL de tampão | Branco |

Diluição de amostras de pacientes e controles: dilua amostras de pacientes e controles 1:100 em tampão de diluição (10 µL de amostra + 990 µL de tampão).

Procedimento do ensaio:

- ✓ Lave a placa três vezes com o tampão de lavagem. Retire o excesso de tampão e verifique se não há bolhas de ar.
- ✓ Adicione 100 µL dos padrões e brancos em duplicata e testes em triplicata aos poços das placas usando o seguinte formato.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S1	S1	T1	T1	T1	T9	T9	T9	T17	T17	T17	-
B	S2	S2	T2	T2	T2	T10	T10	T10	T18	T18	T18	-
C	S3	S3	T3	T3	T3	T11	T11	T11	T19	T19	T19	-
D	S4	S4	T4	T4	T4	T12	T12	T12	T20	T20	T20	-
E	S5	S5	T5	T5	T5	T13	T13	T13	T21	T21	T21	-
F	S6	S6	T6	T6	T6	T14	T14	T14	T22	T22	T22	-
G	S7	S7	T7	T7	T7	T15	T15	T15	T23	T23	T23	-
H	BK	BK	T8	T8	T8	T16	T16	T16	T24	T24	T24	-

S1-S7 - diluições do padrão; T – plasma de teste; BK - branco

- ✓ Sele a placa. Incube por 1 hora em banho-maria a exatamente 37°C.
- ✓ Lave a placa três vezes com o tampão de lavagem. Retire o excesso de tampão e verifique se não há bolhas de ar.
- ✓ Para remover o FVIII endógeno, incube com 100 µL/poço de CaCl₂ 0,4 M por 1 hora em banho-maria a 37°C. Não é necessário agitar.
- ✓ Lave a placa novamente com tampão de lavagem três vezes. Retire o excesso de tampão.
- ✓ Descongele um dos frascos congelados de concentrado de FVIII (recombinado). Adicione 400 µL de concentrado de FVIII a 9,6 mL de tampão de diluição (concentração de ~100 UI/dL).
- ✓ Adicione 100 µL de FVIII diluído a cada poço. Incube por 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave a placa com tampão de lavagem três vezes. Retire o excesso de tampão.
- ✓ O anticorpo primário é dividido em alíquotas de 25 µL e armazenado a -80°C. Faça uma diluição de 1:2000 do anticorpo primário em tampão de diluição (5 µL em 10 mL). Recoloque a alíquota do anticorpo imediatamente no freezer para uso futuro.
- ✓ Adicione 100 µL de anticorpo primário diluído a cada poço. Incube por 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave a placa com tampão de lavagem três vezes. Retire o excesso de tampão.
- ✓ O anticorpo de marcação é dividido em alíquotas de 10 µL e armazenado a -80°C. Faça uma diluição de 1:5000 do anticorpo de marcação em tampão de diluição (2 µL em 10 mL). Recoloque a alíquota do anticorpo imediatamente no freezer para uso futuro.
- ✓ Adicione 100 µL de anticorpo de marcação diluído a cada poço. Incube por 1 hora a 37°C.
- ✓ Lave a placa com tampão de lavagem três vezes. Retire o excesso de tampão.
- ✓ A solução de substrato é preparada apenas durante a última etapa de lavagem. Imediatamente antes do uso, adicione 7 µL de H₂O₂ a 30% a essa solução.
- ✓ Adicione 100 µL da solução acima a cada poço. Acione o cronômetro. Incube por 8-10 minutos.

- ✓ Interrompa a reação adicionando 50 µL de H₂SO₄ 2M a cada poço exatamente no mesmo intervalo de tempo em que o substrato foi adicionado.
- ✓ Selecione o programa apropriado (492 nm) no leitor de placas ELISA. Faça as leituras de OD.

Protocolo de qualidade: analise o controle normal (PNP) e o controle anormal de nível baixo (Dade P). Se houver controles conhecidos de DVW Normandy disponíveis, adicione uma amostra como controle a cada lote.

Interpretação dos resultados: os resultados são expressos em UI/dL. Limites de detecção: menos de 6,25% a mais de 175%.

- ✓ Homozigotos ou heterozigotos compostos para o tipo 2N: VWF:FVIIIIB ausente ou acentuadamente reduzido (<15%) e relações VWF:FVIIIIB/VWF:Ag muito baixas (<0,3). Os níveis de FVIII:C estão leve a moderadamente reduzidos, geralmente variando de 5 a 40 UI/dL. As relações FVIII:C/VWF:Ag também estão reduzidas, geralmente <0,7. Essa relação pode ser normal, especialmente em heterozigotos compostos com mutações quantitativas/nulas de FVW e tipo 2N. Portanto, ensaio de VWF:FVIIIIB ou teste genético pode ser necessário se a suspeita clínica for grande.
- ✓ Heterozigotos para o tipo 2N: VWF:FVIIIIB moderadamente reduzido ou mesmo normal, mas a relação VWF:FVIIIIB/VWF:Ag está reduzida (<0,7). Os níveis de FVIII:C geralmente estão normais ou levemente reduzidos.
- ✓ Hemofilia A leve ou mulheres portadoras de hemofilia: níveis de FVIII:C reduzidos ou normais. Ensaio de VWF:FVIIIIB normal e relação VWF:FVIIIIB/VWF:Ag normal (>0,7).

Multímeros do Fator de Von Willebrand: o FVW é uma grande glicoproteína multimérica que circula no plasma como uma série de subunidades poliméricas idênticas, denominadas múltímeros. Os múltímeros podem ser liberados de forma constante pelas células endoteliais ou armazenados nos corpúsculos de Weibel-Palade nas plaquetas. Os múltímeros compreendem um número variável de subunidades (de 500 kDa a mais de 10.000 kDa de peso molecular) ligadas por ligações dissulfeto. Os múltímeros são categorizados de acordo com o tamanho em múltímeros de baixo (1–5 múltímeros), intermediário (6–10 múltímeros), alto (11–20 múltímeros) e ultragrande (>20 múltímeros) peso molecular (LMWM, IMWM, HMWM e ULMWM) (Stockschlaeder et al, 2014; James et al, 2021). HMWM são importantes para a ligação aos receptores de plaquetas e colágeno durante a hemostasia primária, facilitando a agregação plaquetária. Anormalidades na montagem ou no número de múltímeros podem levar a complicações hemostáticas. A análise de múltímeros é útil para a classificação da DVW que, por sua vez, pode orientar o manejo do paciente. A DVW tipo 1 é um distúrbio quantitativo parcial que demonstra redução quantitativa dos múltímeros normais. O subtipo 1C apresenta sobrevida reduzida do FVW/clearance aumentado do FVW, resultando em sangramento prolongado (Platton et al, 2024).

A DVW tipo 2 é causada por deficiências qualitativas do FVW, e a DVW tipo 3 consiste na ausência total de FVW. A DVW tipo 2 é subdividida em 4 subtipos:

- Tipo 2A, no qual há montagem defeituosa de múltímeros, maior sensibilidade à clivagem pela ADAMTS13 ou menor síntese, levando a redução ou ausência de HMWM.
- Tipo 2B é causado por uma mutação de ganho de função que aumenta a ligação do FVW às plaquetas. Perda de HMWM é relatada na maioria dos casos, mas não em todos.
- Tipo 2M apresenta diminuição da adesão plaquetária ou de colágeno dependente de FVW, com padrão normal de múltímeros do FVW.
- Tipo 2N é causado pela menor afinidade de ligação ao FVIII devido a mutações no sítio de ligação do FVW ao FVIII; padrão normal de múltímeros do FVW é relatado.

Há algumas exceções; padrões de múltímeros normais foram relatados em alguns casos de tipo 2B e, inversamente, alguma perda de HMWM foi relatada em alguns casos variantes de tipo 2M. Múltímeros ultragrandes do FVW podem ser observados na DVW tipo 1C, na PTT e, ocasionalmente, em casos de DVW tipo 2M.

Os métodos tradicionais de visualização de múltímeros são complexos, trabalhosos e demorados, envolvendo eletroforese em gel de agarose com dodecil sulfato de sódio (SDS) seguida de visualização por Western blotting, imunodeteção colorimétrica, autorradiografia, quimioluminescência ou fluorescência. A avaliação dos múltímeros pode ser realizada por inspeção visual ou por quantificação por densitometria (Platton et al, 2024).

No momento da redação deste documento, a técnica mais amplamente utilizada com base na participação em programas de avaliação externa de qualidade é um ensaio semiautomatizado disponível comercialmente, substancialmente mais rápido do que os métodos manuais em gel de agarose com SDS. Esse método para detecção e análise da distribuição de multímeros do FVW em plasma humano por eletroforese em gel de agarose e imunofixação com o instrumento semiautomatizado Hydrasys 2 da Sebia é descrito abaixo (Bowyer et al, 2018).

Análise de multímeros do FVW com Hydrasys da Sebia: H5VWM e H11VWM são ensaios baseados em gel de agarose destinados à separação de proteínas plasmáticas de acordo com seu peso molecular. A separação eletroforética de multímeros do FVW é realizada após o tratamento da amostra com um detergente aniônico. Em excesso desse detergente aniônico, as proteínas são convertidas em complexos detergente aniônico-proteína. Nesses complexos, a conformação original das proteínas é desfeita e todas elas assumem a mesma conformação e a mesma carga negativa por unidade de massa. Quando esses complexos detergente aniônico-proteína são submetidos a eletroforese em um meio com propriedades de tamisação adequadas, como géis H5VWM ou H11VWM, eles se separam de acordo com seu peso molecular. Nos géis H5VWM ou H11VWM, os multímeros do FVW são separados e imunoprecipitados com um antissoro anti-FVW específico. As diferentes bandas são então visualizadas no gel com um anticorpo marcado com peroxidase e um substrato específico. O ensaio é realizado em duas etapas: 1) eletroforese em gel de agarose para separar as proteínas contidas nas amostras de plasma e 2) imunofixação com um antissoro anti-FVW para visualizar os diferentes multímeros.

Equipamentos necessários:

- Pipetas de 10 mL, 100 µL e 10 µL e ponteiros
- Tubos Eppendorf
- Banho-maria
- Temporizador
- Misturador vortex
- Lenços de papel
- Lenços umedecidos com álcool
- Analisador Hydrasys (Sebia, Lisses, França)

Tabela 28. Reagentes para análise de multímeros do FVW com Hydrasys da Sebia

Reagente	Nº do catálogo	Estabilidade
Sebia Hydragel 5 ou 11 kit de multímeros VW	4359	Até a data de validade indicada
Sebia Hydragel kit de visualização de multímeros VW	4747	Até a data de validade indicada
Peróxido de hidrogênio a 30%	Sigma-Aldrich 216763 100 mL	Até a data de validade indicada
Solução descolorante Dilua 5 mL em 5 L de água	4540 (10 frascos de 100 mL)	Solução de trabalho: 1 semana em temperatura ambiente
Hydrasys solução de lavagem Dilua 1 frasco em 5 L de água (8 mL em 500 mL)	4541 (10 frascos de 80 mL)	Solução de trabalho estável até a data de validade indicada
CQ normal		

O método do Hydragel 5 e do Hydragel 11 varia apenas nos volumes de reagente e no tamanho de máscaras/papel mata-borrão.

Preparação da amostra:

- ✓ Aqueça um banho-maria pequeno Grant a 45°C.
- ✓ Descongele o plasma de teste e o CQ a 37°C. O Hydragel 5 comporta 4 pacientes e 1 CQ. O Hydragel 11 comporta 9 pacientes e 2 CQ (mas somente 1 frasco de CQ é necessário).

- ✓ Certifique-se de que o resultado de VWF:Ag seja conhecido antes do início.
- ✓ Identifique os tubos Eppendorf para pacientes e CQ.
- ✓ Agite as amostras de teste no vórtex antes do uso. Dilua as amostras com o diluente de amostra do kit de multímeros nos tubos Eppendorf de acordo com o VWF:Ag da amostra. O limite de detecção de multímeros do FVW é 0,05 UI/mL, o limite de interpretação é 0,11 UI/mL.

VWF:Ag (IU/mL)	Diluição	Diluente de amostra (µL)	Plasma (µL)
<0,20	1/4	30	10
0,20–1,50	1/6	50	10
1,50–3,00	1/10	90	10
>3,00	1/20	95	5

- ✓ Agite no vórtex por 5 segundos.
- ✓ Incube por exatamente 20 minutos a 45°C em banho-maria.
- ✓ Retire os tubos Eppendorf do banho-maria, **agite no vórtex** e deixe em temperatura ambiente por 10 minutos. Durante esses 10 minutos, prepare a migração.

Preparação da migração

- 1) Ligue o Hydrasys 2 e o VDU. Selecione o programa phoresis: [u/n adm p/w sebia](#).
- 2) Preencha a planilha. Registre os números de lote dos kits, wicks [tiras de papel cromatográfico] e gel.
- 3) Selecione "5 VWF" (programa de migração nº 57) ou 11 VWF (programa nº 58) no menu do instrumento (tela à esquerda).

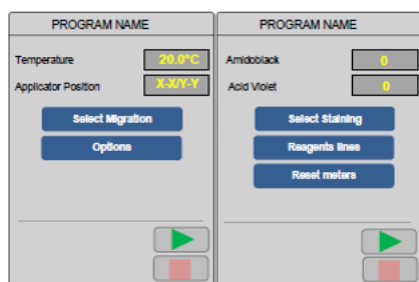


Figura 10. Analisador Hydrasys

- 4) Abra a tampa do módulo de migração, retire o suporte do aplicador e levante o suporte de eletrodos. *****Nunca feche a tampa com o suporte levantado***.**
- 5) Usando as extremidades de plástico, retire as tiras de wick tamponadas da embalagem (verifique se há excesso de água). Fixe-as ao suporte pelos furos, com o revestimento plástico em contato com o suporte (Figura 11).



Figura 11. Analisador Hydrasys

- 6) Hydragel 5: Adicione 100 μ L de água destilada ao terço inferior do quadro impresso no módulo de migração.
- 7) Hydragel 11: Adicione 200 μ L de água destilada ao terço inferior do quadro impresso no módulo de migração.
- 8) Abra o gel e limpe o suporte plástico do gel com lenço de papel para remover o excesso de água.
- 9) Coloque o lado do gel voltado para cima no quadro impresso (Figura 12) com os poços na borda mais próxima.
- 10) Estenda uma máscara de plástico sobre o gel (tamanhos diferentes para Hydragel 5 e 11), alinhada com os marcadores no gel (Figura 12). Evite bolhas de ar, retire e reaplique imediatamente, se presentes.

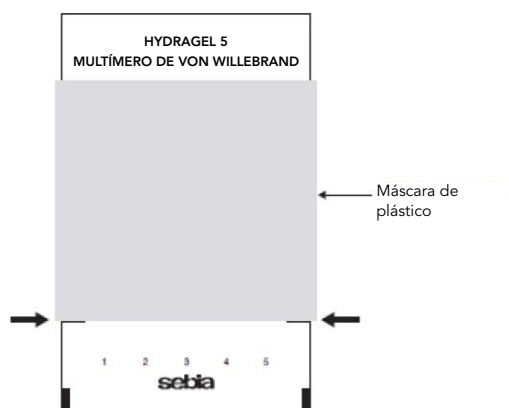


Figura 12. Analisador Hydrasys

- 11) Abaixe com cuidado o suporte de eletrodos sobre o gel e feche o módulo de migração.
- 12) Pressione "start" (▶) [iniciar] na tela e confirme. Isso leva 5 minutos.
- 13) O sinal sonoro sinaliza o fim. Abra o módulo de migração e levante o suporte.
- 14) Usando uma pipeta de 10 μ L com ponteiras finas, sem tocar na lateral ou no fundo do poço, pipete novamente 5 μ L de amostra em cada poço. Hydragel 5: adicione o controle de CQ normal ao poço 5. Hydragel 11: adicione o controle de CQ normal aos poços 1 e 11.
- **Evite bolhas**.** Essa parte deve ser concluída em 2 minutos.
- 15) Abaixe com cuidado o suporte de eletrodos e feche o módulo de migração.
- 16) Pressione "start" (▶) na tela. Isso leva aproximadamente 100 minutos.
- 17) Retire o TTF1 e o TTF2 do refrigerador e deixe-os em temperatura ambiente para liquefazer.

Imunofixação 1 (60 minutos)

- 18) Ao sinal sonoro, a seguinte mensagem é exibida: ↓ANTISERUM VWF [antissoro anti-FVW].
- 19) Abra o módulo, levante e remova o suporte de eletrodos. Descarte os wicks e limpe os eletrodos com lenço de papel macio e úmido.
- 20) Hydragel 5: Em Z5, misture 2,5 mL de diluente antissoro com 60 μ L de antissoro anti-FVW.
- 21) Hydragel 11: Em Z5, misture 5 mL de diluente antissoro com 135 μ L de antissoro anti-FVW.
- 22) Remova a máscara e descarte-a. Coloque a máscara de AS VWF amarela sobre o gel.
- 23) Segure a pipeta na vertical. Aplique a mistura de antissoro gradual e cuidadosamente em uma única aplicação e ****evite bolhas****.
- 24) Feche o módulo de migração e pressione "start" (60 minutos).
- 25) Ao ouvir o sinal sonoro, abra a tampa e remova o antissoro.
- 26) Segure a pipeta na vertical, pressione levemente e retire o antissoro, descartando-o em seguida.
- 27) Remova a máscara e limpe-a com água; recomenda-se o uso de uma escova pequena. Deixe secar.

Absorção no gel 1 (10 minutos)

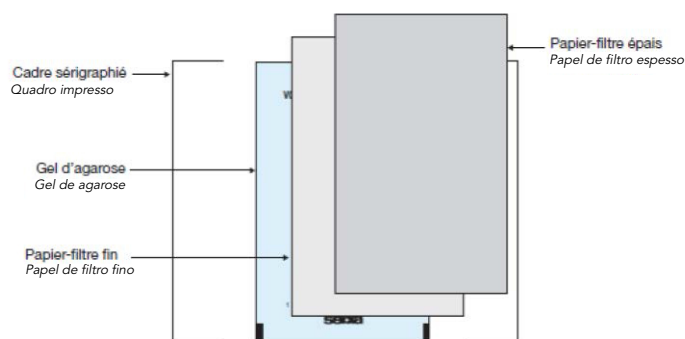


Figura 13. Analisador Hydrasys

- 28) Aplique um papel de filtro fino e um papel de filtro espesso (lado liso para baixo) no gel (Figura 13). Coloque o vidro e, em seguida, o peso.
- 29) Feche a tampa e pressione "start".

Lavagem do Gel 1 (20 minutos)

- 30) Remova os papéis de filtro e adicione a máscara de lavagem/reidratação laranja.
- 31) Hydragel 5: Adicione 4,5 mL de solução de lavagem **vermelha** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 32) Hydragel 11: Adicione 9 mL de solução de lavagem **vermelha** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 33) Feche a tampa e pressione "start".

Absorção no gel 2 (10 minutos)

- 34) Remova a solução de lavagem **vermelha**, depois a máscara e adicione os papéis de filtro espesso e fino, o vidro e o peso.
- 35) Feche a tampa e pressione "start".
- 36) Lave a máscara.

Lavagem intermediária do gel e absorção com papel fino (10 minutos + 5 segundos)

- 37) Abra a tampa. Remova os papéis de filtro e adicione a máscara de lavagem/reidratação laranja.
- 38) Hydragel 5: Adicione 4,5 mL de solução de lavagem intermediária **verde**.
- 39) Hydragel 11: Adicione 4,5 mL de solução de lavagem intermediária **verde**.
- 40) Feche a tampa e pressione "start".
- 41) Abra a tampa e remova a solução de lavagem intermediária verde. Aplique apenas um papel de filtro **fino**. Pressione "start". Após 5 segundos, remova o papel fino.

Imunofixação 2 (30 minutos)

- 42) Hydragel 5: Misture 4 mL de diluente antissoro com 2 µL de anti-IgG-PER em z5.
- 43) Hydragel 11: Misture 8 mL de diluente antissoro com 4 µL de anti-IgG-PER em z5.
- 44) Aplique a máscara de IgG-PER laranja e adicione a mistura anti-IgG-PER.
- 45) Feche a tampa e pressione "start".

Absorção no gel 3 (10 minutos)

- 46) Abra a tampa, remova o anti-IgG-PER e descarte. Remova e lave a máscara. Adicione os papéis de filtro fino e espesso, o vidro e o peso.
- 47) Feche a tampa e pressione "start".

Lavagem do Gel 2 (20 minutos)

- 48) Remova os papéis de filtro e adicione a máscara de lavagem/reidratação laranja.
- 49) Hydragel 5: Adicione 4,5 mL de solução de lavagem **vermelha** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 50) Hydragel 11: Adicione 9,0 mL de solução de lavagem **vermelha** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 51) Feche a tampa e pressione "start".

Absorção no gel 4 (10 minutos)

- 52) Remova a solução de reidratação, depois a máscara e adicione os papéis de filtro espesso e fino, o vidro e o peso.
- 53) Feche a tampa e pressione "start".
- 54) Lave a máscara.

Reidratação do gel 1 (10 minutos)

- 55) Remova os papéis de filtro e adicione a máscara de lavagem/reidratação laranja.
- 56) Hydragel 5: Adicione 4,5 mL de solução de **reidratação** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 57) Hydragel 11: Adicione 9,0 mL de solução de **reidratação** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 58) Feche a tampa e pressione "start".

Absorção no gel 5 (10 minutos)

- 59) Remova a solução de reidratação, depois a máscara e adicione os papéis de filtro espesso e fino, o vidro e o peso.
- 60) Feche a tampa e pressione "start".
- 61) Lave a máscara.

Reidratação do gel 2 (10 minutos)

- 62) Remova os papéis de filtro e adicione a máscara de lavagem/reidratação laranja.
- 63) Hydragel 5: Adicione 4,5 mL de solução de **reidratação** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 64) Hydragel 11: Adicione 9,0 mL de solução de **reidratação** à máscara. ****Evite bolhas****.
- 65) Feche a tampa e pressione "start".
- 66) Agite TTF 1 e TTF2 no vórtex.
- 67) Hydragel 5: Adicione 75 µL de TTF1 a 3,0 mL de solvente TTF em z5. Inverta para misturar. Adicione 75 µL de TTF2, inverta para misturar. Adicione 3 µL de peróxido de hidrogênio (30%), inverta para misturar.
- 68) Hydragel 11: Adicione 150 µL de TTF1 a 6,0 mL de solvente de visualização TTF em z5. Inverta para misturar. Adicione 150 µL de TTF2, inverta para misturar. Adicione 6 µL de peróxido de hidrogênio (30%), inverta para misturar.

Visualização (10 minutos)

- 69) Remova a solução de reidratação da máscara. Coloque a máscara de TTF1/TTF2 laranja sobre o gel.
- 70) Hydragel 5: Aplique 2,5 mL da mistura de TTF. ****Evite bolhas****.
- 71) Hydragel 11: Aplique 5 mL da mistura de TTF. ****Evite bolhas****.
- 72) Feche a tampa e pressione "start".

Absorção no gel 6 (5 minutos)

- 73) Remova a solução de TTF, depois a máscara e adicione os papéis de filtro espesso e fino, o vidro e o peso.
- 74) Feche a tampa e pressione "start".
- 75) Lave a máscara com água e use um lenço umedecido com álcool.

Reidratação do gel 3 (5 minutos)

- 76) Remova os papéis de filtro e adicione a máscara de lavagem/reidratação laranja.
- 77) Hydragel 5: Adicione 4,5 mL de solução de **reidratação** à máscara. ****Evite bolhas****.

- 78) Hydralgel 11: Adicione 9,0 mL de solução de **reidratação** à máscara. ****Evite bolhas****.
79) Feche a tampa e pressione "start".

Absorção no gel 7 (5 minutos)

- 80) Remova a solução de reidratação, depois a máscara e adicione os papéis de filtro espesso e fino, o vidro e o peso.
81) Feche a tampa e pressione "start".
82) Lave a máscara.

Secagem do gel (10 minutos)

- 83) Abra a tampa e remova os papéis de filtro.
84) Feche a tampa e pressione "start".

Lavagem e processamento final (25 minutos)

- 85) Abra a tampa e remova o gel.
86) O gel deve ser lavado imediatamente no compartimento de coloração.
87) Abra o suporte do gel e posicione o gel conforme mostrado na Figura 14.

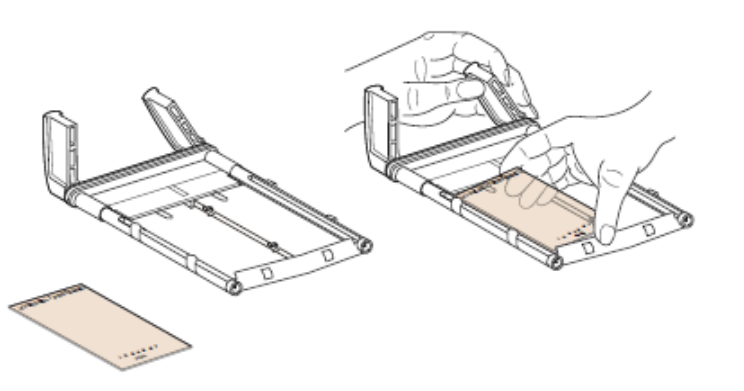


Figura 14. Analisador Hydrasys

- 88) Feche o suporte e coloque-o no módulo de processamento/coloração do gel.
89) Certifique-se de que haja pelo menos 400 mL de solução descolorante e que o recipiente de resíduos esteja vazio.
90) Selecione o programa de lavagem de FVW no menu do instrumento (tela à direita) e pressione "start".

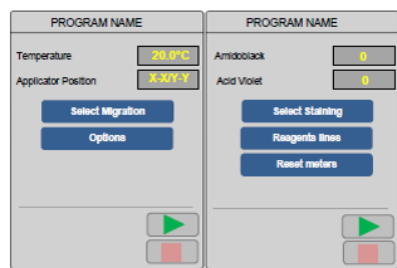


Figura 15. Analisador Hydrasys

Certifique-se de que todas as máscaras sejam lavadas. A máscara de TTP, a unidade de migração do Hydrasys e os eletrodos devem ser cuidadosamente limpos com lenços umedecidos com álcool.

Escaneamento do gel

- 91) Remova o gel e o suporte do módulo de processamento/coloração do gel e coloque-os no módulo de escaneamento.
- 92) No programa Phoresis, crie uma lista de trabalho usando o ícone  na tabela. Comece no nº 1 e adicione os dados do paciente, incluindo SID, nome, data de nascimento, data da amostra, número do hospital e hospital solicitante (para RHH, adicione um consultor).
- 93) Hydragel 5: A amostra 5 é o controle normal (CQ).
- 94) Hydragel 11: as amostras 1 e 11 são o controle normal (CQ).
- 95) Clique em  para abrir a janela de escaneamento de géis e amostras.
- 96) A seguinte janela será aberta:

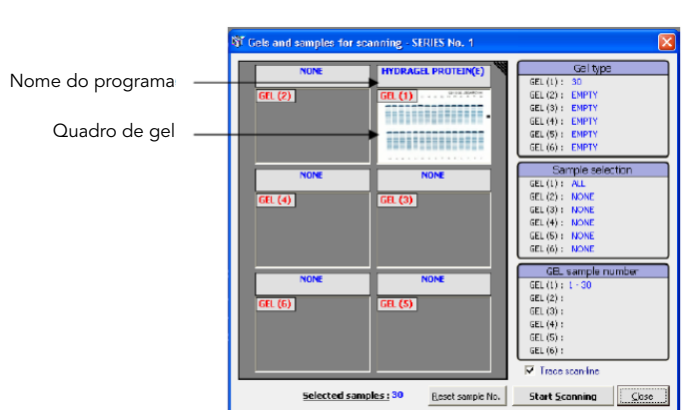


Figura 16. Analisador Hydrasys

- 97) Selecione o programa do primeiro gel escaneado na posição 1. Pressione a caixa de imagens superior direita uma vez para o Hydragel 5 e duas vezes para o Hydragel 11 (pressionar três vezes retorna para 5).
- 98) Pressione "start scanning" [iniciar escaneamento].
- 99) Verifique se o scanner identificou corretamente todas as bandas. Em algumas ocasiões, ele não detecta a primeira banda de LMWM. Nesse caso, selecione "conservative gel localization mode to rescan the image" [modo de localização de gel conservador para escanear novamente a imagem] e, em seguida, escaneie novamente.
- 100) Quando as imagens aparecerem, clique em "view scanning" [visualizar escaneamento], depois em "curve mosaic" [mosaico de curvas] para acessar a densitometria.
- 101) Os gráficos de densitometria individuais aparecerão em caixas:

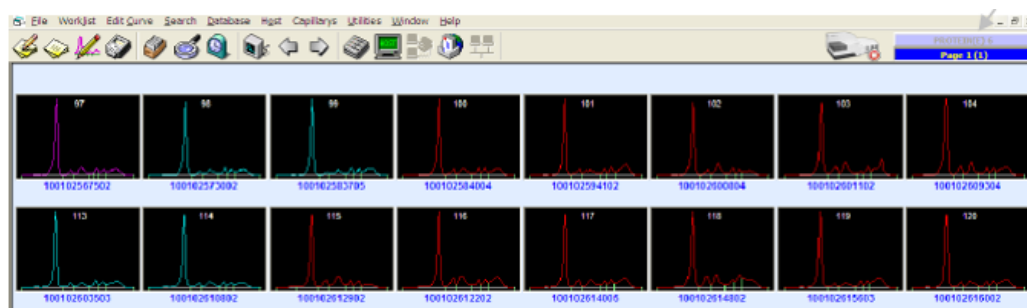


Figura 17. Analisador Hydrasys

Clique na primeira para abrir. **Comece com CQ** – poço 5 para o Hydragel 5 ou 1/11 para o Hydragel 11. Os resultados de CQ aparecem:

Observação: se os resultados não puderem ser avaliados no dia do teste, eles ainda poderão ser obtidos retrospectivamente. Abra o programa Phoresis e selecione a data do teste onde a seta preta está na Figura 18 e siga as instruções abaixo.

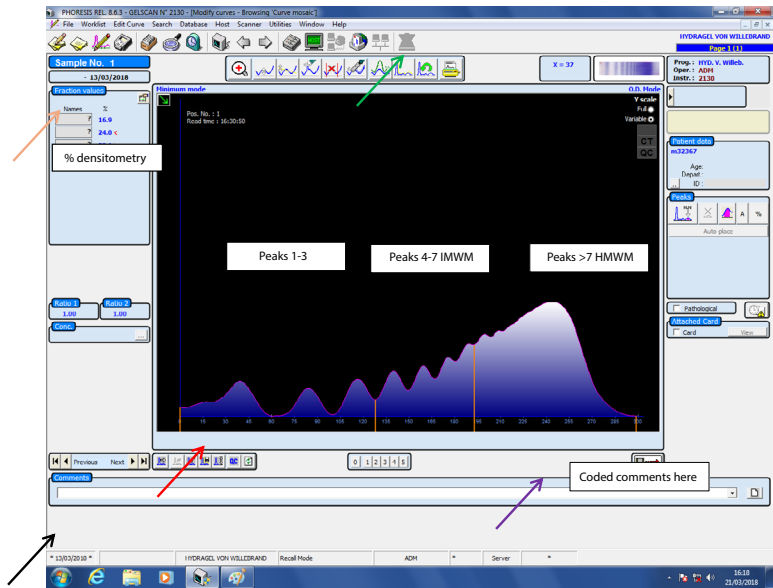


Figura 18. Analisador Hydrasys

Defina o padrão de referência clicando no 4º ícone em densitometria – seta **vermelha**. Defina a curva atual como padrão de referência. Observação: selecione apenas um dos resultados de CQ para o Hydragel 11.

- 102) Clique na curva de densitometria para definir LMWM (picos 1–3), IMWM (picos 4–7) e HMWM (picos >7).
- 103) A porcentagem dos picos aparecerá e precisará ser identificada – seta **laranja**.
- 104) Verifique se os resultados de CQ estão dentro das faixas esperadas. Caso não estejam, não relate os resultados do paciente e fale com um funcionário sênior responsável pelos ensaios. Salve os resultados (ícone de disquete) e mova para pacientes.
- 105) Repita 111+112 com cada paciente e, para os resultados do paciente, clique para sobrepor o padrão de CQ de referência – seta **verde**.
- 106) Usando as faixas de referência para adultos, decida se a densitometria está normal ou anormal e selecione os comentários apropriados na caixa suspensa de comentários (seta **roxa**). Observe que apenas 1 comentário pode ser adicionado a cada resultado. O nível de HMWM é o mais clinicamente relevante.

Tabela 29. Nível de HMWM e comentário que pode ser adicionado aos resultados

Comentário	Valor
SRHMWM (redução discreta de multímeros de alto peso molecular)	HMWM 30%-limite inferior da faixa normal
RHMWM (redução de multímeros de alto peso molecular)	HMWM 15-30%
GRHMW (grande redução de multímeros de alto peso molecular)	HMWM <15%
SIHMWM (aumento discreto de multímeros de alto peso molecular)	HMWM >limite superior da faixa normal
SILMWM (aumento discreto de multímeros de baixo peso molecular)	LMWM limite superior da faixa normal a 26%
ILMWM (aumento de multímeros de baixo peso molecular)	LMWM >26%
QNORM/QNORM com quantidades reduzidas	LMWM e HMWM dentro das faixas normais

- 107) A repetição do teste pode ser necessária no caso de amostras com multímeros muito altos ou muito baixos. Fale com um BMS sênior treinado neste ensaio.
- 108) Quando todos os pacientes forem concluídos, clique na aba "edit curve" [editar curva] e imprima os relatórios em arquivo PDF por meio do PDF Creator.
- 109) Isso exportará todos os resultados para uma pasta na área de trabalho (atalho para PDF). Encontre a data atual e copie (ou envie) para o pendrive.
- 110) Uma cópia JPEG do gel também é salva em imagens. Copie (ou envie) para um pendrive.
- 111) Certifique-se de que o gel esteja rotulado com a data do teste, cole na planilha e arquive na pasta de resultados.
- 112) Certifique-se de que os resultados normais de CQ estejam dentro dos limites aceitáveis.
- 113) Realize e registre a limpeza mensal, conforme necessário.

Tabela 30. Faixa de referência de LMWM, IMWM e HMWM para adultos

	N	Média (%)	Faixa em % (IC 95%)
LMWM	51	17,3	11,8–23,6
IMWM	51	33,0	24,6–42,0
HMWM	51	49,9	35,0–58,5

Interpretação dos testes de von Willebrand: a DVW é o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum, com prevalência estimada de até 1%. Apenas 10% desses indivíduos são sintomáticos, e 10% deles comparecem a hospitais. Uma estimativa conservadora da prevalência é de 100 por milhão de pessoas, com cerca de 80% delas em países em desenvolvimento. A DVW é causada por uma deficiência quantitativa e/ou qualitativa da proteína plasmática FVW. Ao contrário da maioria dos outros fatores de coagulação, o FVW funciona na hemostasia como uma proteína adesiva que se liga a vários ligantes que são componentes críticos do processo hemostático. Liga-se ao receptor GPIb das plaquetas e ao colágeno subendotelial, promovendo a adesão plaquetária. Também agrega plaquetas ligando-se ao receptor GPIIb/IIIa. Outra função importante do FVW é servir como proteína transportadora do FVIII e prevenir a degradação proteolítica do FVIII. Na ausência do FVW, a meia-vida do FVIII é reduzida de 8-12 horas para 2 horas. A DVW pode ser classificada em três subtipos principais, de acordo com defeitos quantitativos (DVW tipo 1 e 3) e qualitativos (DVW tipo 2). A DVW tipo 2 é subdividida em 4 subtipos: 2A, 2B, 2M e 2N. Os fenótipos laboratoriais dos diferentes subtipos estão resumidos na Tabela 31.

- 1) DVW tipo 1: Deficiência quantitativa parcial de FVW.
- 2) DVW tipo 2: Defeito qualitativo. Uma ou mais funções do FVW são anormais, conforme avaliado pelo ensaio de atividade do FVW (descrito abaixo).
 - a. DVW tipo 2A: Perda seletiva ou deficiência de HMWM. Os maiores multímeros são as formas funcionalmente mais ativas. A perda seletiva desses multímeros provoca diminuição da adesão plaquetária dependente de FVW e da capacidade de ligação ao colágeno.
 - b. DVW tipo 2B: Maior afinidade do FVW pela GPIb plaquetária que leva à ligação espontânea do FVW às plaquetas, que é eliminado da circulação, causando perda de HMWM e trombocitopenia. O esfregaço periférico também pode mostrar plaquetas grandes e aglomerados de plaquetas. A DVW tipo plaquetária (pseudo DVW) também pode apresentar um fenótipo semelhante.
 - c. DVW tipo 2M: Diminuição da adesão plaquetária dependente de FVW sem perda de HMWM. Distribuição normal de multímeros.
 - d. DVW tipo 2N: Diminuição da afinidade de ligação do FVW ao FVIII.
- 3) DVW tipo 3: Ausência total/níveis indetectáveis de FVW, geralmente VWF:Ag <3 UI/dL.

Variáveis pré-analíticas no diagnóstico de DVW: questões pré-analíticas podem influenciar significativamente o diagnóstico de DVW. O FVW e o FVIII são reagentes de fase aguda que podem aumentar após inflamação, trauma, estresse, gravidez e exercício, potencialmente mascarando o diagnóstico de DVW. A coleta de amostras deve ser evitada nesses momentos, ou o teste deve ser repetido em um momento diferente, antes de excluir o diagnóstico de DVW. Coleta, transporte e processamento inadequados de amostras (por exemplo, tubos subpreenchidos, amostra ou soro coagulado, atraso no transporte de amostras, transporte de amostra de sangue total refrigerada ou em gelo e congelamento e descongelamento

ineficazes ou ciclos repetidos de congelamento e descongelamento) podem comprometer o diagnóstico de DVW. As amostras de FVW devem, idealmente, ser coletadas e processadas no mesmo local para evitar esses erros.

Testes no repertório para diagnóstico de DVW:

Testes de triagem

Histórico de sangramento e ferramenta de avaliação de sangramento (BAT): o histórico de sangramento pode ser considerado o primeiro teste de triagem na avaliação de um paciente com sintomas de sangramento. O histórico detalhado referente a natureza e frequência dos sangramentos, combinado com o histórico familiar, pode fornecer pistas importantes para o diagnóstico. Sangramentos mucocutâneos (por exemplo, sangramentos cutâneos, sangramento gengival, epistaxe, sangramento de pequenas feridas, sangramento GI e menorragia) são o padrão típico de sangramento observado na DVW. Hemartrose é rara e geralmente observada apenas na DVW tipo 3, quando o FVIII está significativamente reduzido. As novas diretrizes enfatizam a importância do histórico de sangramento e do uso de BATs. Existem muitas BATs disponíveis, como Vicenza, MCMDM-1, *Pictorial bleeding assessment chart* (PBAC) e Questionário de sangramento infantil. Em 2010, a ISTH propôs uma nova BAT que incluía 14 sintomas de sangramento, cada um classificado de 0 a 4. A faixa de referência para a BAT da ISTH, obtida a partir de 1040 adultos saudáveis e 330 crianças, foi <3 para crianças, <4 para homens adultos e <6 para mulheres adultas. O principal valor clínico da BAT é excluir um distúrbio hemorrágico. Em um cenário de baixa prevalência, Tosetto et al constataram que uma pontuação ≤3 tinha valor preditivo negativo de 99,2%, o que essencialmente descarta um distúrbio hemorrágico. A ISTH recomenda o uso de uma BAT validada para triar pacientes com baixa probabilidade de DVW (por exemplo, ambiente de atenção primária). No entanto, não é confiável usar BAT quando a probabilidade de DVW é intermediária (por exemplo, encaminhamento para hematologista) ou alta (por exemplo, parente de primeiro grau com DVW).

Tempo de sangramento cutâneo (SBT): o SBT é um teste *in vivo* de hemostasia primária que foi descrito pela primeira vez pelo médico francês Milian em 1901 e posteriormente modificado por Duke em 1910. A sensibilidade geral do SBT para o diagnóstico de DVW é de cerca de 60% (variando de 21% a 72%), mas ele tem sensibilidade muito boa para DVW grave (100% para DVW tipo 3). Portanto, continua sendo um teste útil em um cenário com recursos limitados para diferenciar hemofilia A de DVW grave.

Analizador de Função Plaquetária 200: o Analizador de Função Plaquetária (PFA100/200, Siemens, Dade Behring, Alemanha) é um dispositivo projetado para medir a hemostasia primária em condições de alto cisalhamento. Registra o tempo que o sangue total do paciente leva para formar um tampão plaquetário estável na abertura do dispositivo, ocluindo-o, e é registrado como "tempo de fechamento (CT)". O PFA100/200 demonstrou sensibilidade geral de cerca de 85-90%, com quase 100% de sensibilidade para DVW tipo 3 e tipo 2. A sensibilidade para DVW tipo 1 variou de acordo com os níveis de FVW. O PFA 100/200 é um instrumento caro, não disponível na maioria dos países de baixa e média renda.

TTPA: o TTPA é prolongado apenas em casos graves de DVW quando o FVIII também é reduzido, geralmente na DVW tipo 3, na DVW tipo 2N e em alguns subtipos do tipo 1 e 2, dependendo dos níveis de VWF:Ag.

Ensaio de FVW específicos para diagnóstico de DVW: a classificação da DVW requer testes para quantificar a proteína FVW e testes para avaliar a função do FVW. O FVW liga-se a 1) plaquetas e colágeno subendotelial para promover a adesão plaquetária, 2) plaquetas ativadas para promover agregação plaquetária, e 3) FVIII para prevenir sua degradação prematura. Os ensaios funcionais para DVW avaliam uma ou mais dessas funções do FVW. Uma discrepância entre o ensaio funcional e o ensaio de antígeno é sugestiva de defeito qualitativo determinado pelo cálculo da razão entre o ensaio de atividade e antígeno do FVW. Uma razão <0,6 ou <0,7 pode ser usada dependendo da preferência do laboratório.

Antígeno de Von Willebrand (VWF:Ag): o ensaio mede a quantidade total de proteína FVW presente na amostra, tanto funcional quanto não funcional. A metodologia mais comum utilizada é o LIA automatizado. Métodos baseados em ELISA e, mais recentemente, CLIA no instrumento HemosIL Acustar também podem ser utilizados.

Ensaio de atividade do FVW dependente de plaquetas ou GP1b: esses ensaios medem especificamente a capacidade do FVW de se ligar às plaquetas e, portanto, são usados para diferenciar entre DVW tipo 1 e DVW tipo 2A/2B/2M.

- 1) *Ensaio de cofator de ristocetina (VWF:RCo):* na ausência de qualquer tensão de cisalhamento, a ristocetina serve de substituto para induzir alterações no FVW e causar aglutinação de plaquetas-FVW. O grau de aglutinação é proporcional à quantidade de FVW funcional presente no plasma, que pode ser medida por meio de agregômetro ou pelo aumento da turbidez por métodos automatizados. O ensaio automatizado de VWF:RCo demonstrou maior precisão e melhor limite de detecção quando comparado aos métodos baseados em agregometria.

O ensaio de VWF:RCo tem limitações significativas. O ensaio apresenta alto CV inter e intralaboratorial, com potencial de resultados falsamente altos ou falsamente baixos. Além disso, o limite inferior de detecção é alto, geralmente 80-20 UI/dL, o que representa um problema na identificação de variantes do tipo 2 quando os níveis de VWF:Ag estão baixos. Certos polimorfismos comumente observados na população africana podem levar a níveis falsamente baixos de VWF:RCo, mesmo na ausência de DVW.
- 2) *VWF:GP1R:* esse ensaio é semelhante ao VWF:RCo, no qual as plaquetas são substituídas por micropartículas (esferas de látex no LIA [HemosIL] e partículas magnéticas no CLIA [AcuStar]) revestidas com fragmentos de GP1b recombinante selvagem. O ensaio apresenta CV e limites inferiores de detecção mais baixos do que o ensaio de VWF:RCo original. Sua utilidade clínica na DVW foi demonstrada em vários estudos.
- 3) *VWF:GP1M:* ao contrário de outros ensaios de FVW dependentes de plaquetas, esse ensaio não utiliza ristocetina. As plaquetas são substituídas por fragmentos de GP1b recombinante com mutações de ganho de função, aos quais o FVW se liga "espontaneamente". VWF:GP1bM pode ser medido por LIA (ensaio Siemens Innovance VWF Ac) ou mesmo por alguns métodos não comerciais baseados em ELISA. O teste tem boa reprodutibilidade, baixo limite de detecção e fornece informações comparáveis aos ensaios de VWF:RCo e VWF:GP1bR para o diagnóstico de DVW tipo 2.
- 4) *VWF:Ab:* esse ensaio baseia-se em anticorpos monoclonais direcionados contra o sítio de ligação plaquetária (ou seja, GP1b) do FVW. Embora não seja um ensaio verdadeiramente funcional, pode ser considerado um substituto para atividade de ligação plaquetária. Diversos estudos demonstraram a utilidade do ensaio automatizado de VWF:Ab (HemosIL Atividade do FVW, IL, Bedford, Massachusetts) na avaliação inicial e subclassificação da DVW.

Novas diretrizes recomendam o uso de ensaios mais recentes de atividade do FVW dependente de plaquetas, como VWF:GP1bR e VWF:GP1bM em vez de VWF:RCo (automatizados ou não automatizados).

Ensaio de ligação ao colágeno (VWF:CB): o VWF:CB avalia a capacidade do FVW de se ligar ao colágeno e depende da presença de HMWM e de um sítio de ligação ao colágeno intacto. Pode ser usado como substituto da análise de multímeros para diferenciar o tipo 2A do tipo 2M. A relação VWF:CB/antígeno é normal no tipo 2M e reduzida no tipo 2A/2B. O ensaio de VWF:CB demonstrou ser mais eficaz na distinção entre DVW tipo 1 e tipo 2 (exceto 2M) do que o ensaio de VWF:RCo. Pode ser usado para distinguir DVW tipo 1 grave do tipo 3 devido ao seu melhor limite de detecção. VWF:CB pode ser medido por vários ensaios ELISA comerciais e não comerciais e, mais recentemente, pelo método CLIA.

Aglutinação plaquetária induzida por ristocetina (RIPA): a resposta de aglutinação à ristocetina em doses normais (>1 mg/mL) e baixas (<1 mg/mL) é um dos testes utilizados no diagnóstico de DVW. Embora resposta ausente possa ser observada nos subtipos de DVW tipo 3 e grave, sua principal utilidade é na identificação de DVW tipo 2B e plaquetária, em que resposta é observada mesmo com baixas doses de ristocetina. A diferenciação entre DVW tipo 2B e plaquetária pode ser feita por meio de testes de desafio com crioprecipitado ou de mistura com plasma normal e/ou plaquetas de controle. Se disponíveis, testes genéticos devem ser utilizados.

Ensaio de ligação ao FVIII: esse teste avalia a capacidade do FVW de se ligar ao FVIII. O ensaio de VWF:FVIII-B reduzido e a relação VWF:FVIII-B/VWF:Ag reduzida sugerem a presença de DVW tipo 2N.

Análise de multímeros: a avaliação de multímeros do FVW é um teste estabelecido na avaliação de DVW, principalmente para diferenciar entre o tipo 2A e o tipo 2M. Porém, o teste é muito trabalhoso, tecnicamente exigente e está desaparecendo rapidamente da maioria dos laboratórios.

Ensaio de desmopressina: Vicenza tipo 1C é um subtipo de DVW tipo 1 associado ao aumento do clearance de FVW. Esses pacientes apresentam uma resposta exagerada à desmopressina, mas com expectativa de vida mais curta. Nível acima do normal da relação propeptídeo do FVW/VWF:Ag também é observado nesses pacientes.

Tabela 31. Fenótipo laboratorial de diferentes subtipos de DVW

Tipo de DVW	FVIII	Antígeno de von Willebrand (VWF:Ag)	Ensaio de atividade do FVW dependentes de plaquetas*	Ensaio de ligação ao colágeno (VWF:CB)	Ensaio de ligação ao fator VIII (VWF:FVIIIIB)	Razão de ensaio de FVW plaquetário / Ag [§]	Relação VWF:CB/Ag [§]	Análise de multímeros	Agglutinação plaquetária induzida por ristocetina (RIPA)	Comentários
DVW tipo 1	reduzido ou normal	reduzido	reduzido	reduzido	normal	normal	normal	normal	reduzido ou normal	Níveis de FVW <30 UI/dL ou níveis de FVW 30-50 UI/dL com sangramento anormal são considerados DVW tipo 1, de acordo com as novas diretrizes. Alternativamente, níveis de FVW 30-50 UI/dL podem ser classificados como FVW baixo com risco leve de sangramento.
DVW tipo 2A	reduzido ou normal	reduzido ou normal	reduzido	reduzido	normal	reduzido	reduzido	Perda de multímeros altos a intermediários	Geralmente reduzido	Os tipos 2A e 2B podem ser distinguidos por RIPA.
DVW tipo 2B	reduzido ou normal	reduzido ou normal	reduzido	reduzido	normal	reduzido	reduzido	Perda de multímeros de HMW	Resposta observada com ristocetina em baixas doses	Tipo 2B vs. plaquetário distinguidos por estudos de mistura com RIPA ou testes genéticos
DVW tipo 2M	reduzido ou normal	reduzido ou normal	reduzido	reduzido	normal	reduzido	Geralmente normal	normal	reduzido ou normal	DVW tipo 2M com defeito na ligação ao colágeno pode ter relação VWF:CBA/ag reduzida
DVW tipo 2N	reduzido (relação FVIII/VWF:Ag geralmente <0,7)	Geralmente normal [#]	Geralmente normal [#]	Geralmente normal [#]	reduzido Relação VWF: FVIIIIB/Ag reduzida (<0,7)	normal	normal	normal	normal	Fenótipo semelhante a hemofilia A leve/moderada ou portador, confirmado com ensaio de VWF:FVIIIIB ou teste genético
DVW tipo 3	reduzido, geralmente 1–10 UI/dL	Acentuadamente reduzido <2 UI/dL	Acentuadamente reduzido	Acentuadamente reduzido	NA	NA	NA	Ausente	Resposta ausente que corrige com a adição de crioprecipitado	As razões atividade/antígeno do FVW não devem ser calculadas

*Ensaio de FVW dependentes de plaquetas incluem VWF:RCO, VWF:GP1M, VWF:GP1R ou VWF:Ab.

[#]Ensaio de VWF:Ag ou de atividade podem ser reduzidos na DVW tipo 2N, quando observados em um estado heterozigoto composto com mutações nulas/quantitativas de FVW associadas.

[§] Para determinar um defeito qualitativo, calcula-se a razão entre o ensaio de atividade e o ensaio de antígeno do FVW. Uma razão menor que 0,6 ou 0,7 pode ser usada (dependendo da preferência do laboratório) para classificar a DVW tipo 2.

Diagnóstico de Doença de Von Willebrand no Cenário de Poucos Recursos: a DVW é o distúrbio hemorrágico hereditário mais comum, com prevalência estimada de 1%. Uma estimativa conservadora de prevalência é de 100 por milhão de pessoas, com cerca de 80% delas no mundo em desenvolvimento. Apenas 2,6% do total de casos de DVW relatados são provenientes do Sul da Ásia e da África Subsaariana, embora contribuam com aproximadamente 40% da população total em todo o mundo. A DVW é dividida em três subtipos principais. A DVW tipo 3 é causada por deficiência quantitativa grave de FVW devido a níveis indetectáveis de FVW. A DVW tipo 1 é causada por deficiência quantitativa parcial. A DVW tipo 2 é uma deficiência qualitativa e é subdividida em quatro tipos - 2A, 2B, 2M e 2N. Há uma grande disparidade na distribuição dos subtipos de DVW em diferentes partes do mundo. Na maioria dos países de renda alta e média-alta (HIC e UMIC), o tipo 1 é o subtipo mais comum (60–80%), seguido pelo tipo 2. A DVW tipo 3 é rara e geralmente constitui menos de 5% dos casos. Em contraposição, a frequência da DVW tipo 3 é maior em muitos países de renda baixa e média-baixa (LIC e LMIC), chegando a 64% em algumas partes, o que está bem resumido em um artigo de revisão de Favaloro et al. Essa diferença marcante no padrão de distribuição pode ser atribuída ao fato de que a maioria dos dados dos países LMIC é de registros hospitalares onde apenas os pacientes mais graves podem comparecer, e os mais leves não são detectados. Outro fator contribuinte é o aumento da consanguinidade e dos casamentos em pequenas comunidades, o que aumenta a incidência da DVW tipo 3, uma doença hereditária autossômica recessiva. Há uma subnotificação considerável de DVW, particularmente em países LIC e LMIC. Stonebraker et al relataram que a prevalência média de DVW em países HIC, UMIC, LMIC e LIC foi de 60,3, 12,6, 2,5 e 1,1 por milhão, respectivamente, o que foi significativamente diferente em relação à classificação de renda, frequentemente <1 por milhão em muitos países LIC. No entanto, a variabilidade na prevalência de DVW tipo 3 é menos acentuada, o que sugere que pacientes com DVW tipo 3 foram diagnosticados com mais frequência do que outros subtipos nesses países.

Obstáculos no diagnóstico de DVW no cenário de poucos recursos

Baixa prioridade para cuidados de saúde e distúrbios hemorrágicos: os cuidados de saúde recebem baixa prioridade, social e politicamente, na maioria dos países em desenvolvimento, onde apenas 1% a 2% do produto interno bruto é destinado à saúde. Desse orçamento limitado, questões mais urgentes de importância para a saúde pública, como doenças infecciosas, mortalidade infantil e materna e desnutrição, têm precedência sobre condições relativamente mais raras, como distúrbios hemorrágicos hereditários, incluindo DVW.

Acesso precário à rede de saúde e altos custos com assistência médica: em muitos países em desenvolvimento, a infraestrutura de saúde é mal desenvolvida, com poucos hospitais que não são facilmente acessíveis a todos. Esse pode ser o motivo da maior incidência de DVW grave em países em desenvolvimento, onde apenas os pacientes com sangramento mais grave comparecem ao hospital. O alto custo dos exames, a incapacidade de arcar com as despesas de deslocamento envolvidas, a necessidade de interromper o emprego para realizar os exames e a cobertura mínima do seguro saúde contribuem para o subdiagnóstico de casos leves de DVW.

Indisponibilidade de reagentes para FVW e falta de infraestrutura laboratorial: as novas diretrizes para DVW de 2021 sugerem o uso de ensaios de atividade dependentes de plaquetas mais recentes, como VWF:GP1R e VWF:GP1M, para o diagnóstico de DVW. Entretanto, esses kits de ensaio não estão disponíveis ou não são utilizados na maioria dos países LMIC e LIC. Outros problemas, como atraso no fornecimento de reagentes, manutenção inadequada das condições de transporte, baixo índice de encaminhamento de amostras, baixa validade dos reagentes e menor número de centros de encaminhamento, também contribuem para a escassez de instalações de testes de DVW.

Superando os obstáculos no diagnóstico de DVW no cenário de poucos recursos

Melhorar a identificação de casos de DVW por meio de BATs e testes de triagem baratos e de fácil acesso: os testes de triagem para DVW incluem tempo de sangramento cutâneo (SBT) e tempo de fechamento no Analisador de Função Plaquetária (PFA-200). Em nosso centro, analisamos uma grande coorte de pacientes (n = 444) com FVW reduzido <50 UI/dL entre pacientes avaliados por suspeita de distúrbio hemorrágico durante um período de 7 anos, de janeiro de 2012 a março de 2019. A maioria dos pacientes apresentava fenótipo tipo 3 (48,3%), em conformidade com outros estudos publicados na Índia. Os pacientes também foram subclassificados de acordo com a gravidade, com base nos níveis de VWF:RCo, como graves (<10%), moderados (10–30%) e leves (>30%), de acordo com a classificação proposta

por Federici et al. (2014). A sensibilidade geral do SBT e do PFA-200 foi de 72% e 95%, conforme mostrado na Figura 19. É importante ressaltar que o SBT teve sensibilidade de 100% na identificação de DVW tipo 3 e sensibilidade muito alta de 92% na DVW grave, que incluía casos graves de tipo 1 e tipo 2. O SBT foi comparável ao PFA-200 nessas duas categorias. De modo geral, pontuação anormal de BAT da ISTH foi observada em 75% dos casos de DVW.

Desde o advento do PFA-200 em 1995, inúmeras publicações corroboram seu uso para diagnóstico e monitoramento da DVW, e ele substituiu o tempo de sangramento como teste de triagem para DVW na maioria dos países desenvolvidos. Todas as diretrizes também desencorajam o uso de SBT na investigação diagnóstica de DVW. A sensibilidade do SBT e do PFA-100/200 é semelhante para distúrbios da função plaquetária e para DVW grave. Embora o PFA-100/200 tenha boa sensibilidade para DVW, é um instrumento caro que a maioria dos laboratórios em países em desenvolvimento não pode usar e, portanto, não pode substituir o SBT nesse cenário. A maioria dos casos de DVW em países LIC e LMIC apresenta DVW grave, cujo diagnóstico é frequentemente ignorado ou os indivíduos são diagnosticados erroneamente com hemofilia A. Em cenários com recursos limitados, onde a infraestrutura laboratorial, as instalações e a disponibilidade de reagentes são limitadas, o tempo de sangramento é um teste de triagem com boa relação custo-benefício para identificar DVW grave em pacientes com histórico familiar/histórico de sangramento significativo. Possíveis casos devem ser preferivelmente identificados por meio de BAT, como a BAT da ISTH. É importante observar que o SBT deve ser usado apenas em pacientes com suspeita de distúrbio hemorrágico e não como teste de triagem pré-operatório ou para avaliar a resposta a medicamentos antiplaquetários. Além disso, casos mais leves de DVW podem apresentar SBT normal e passar despercebidos.

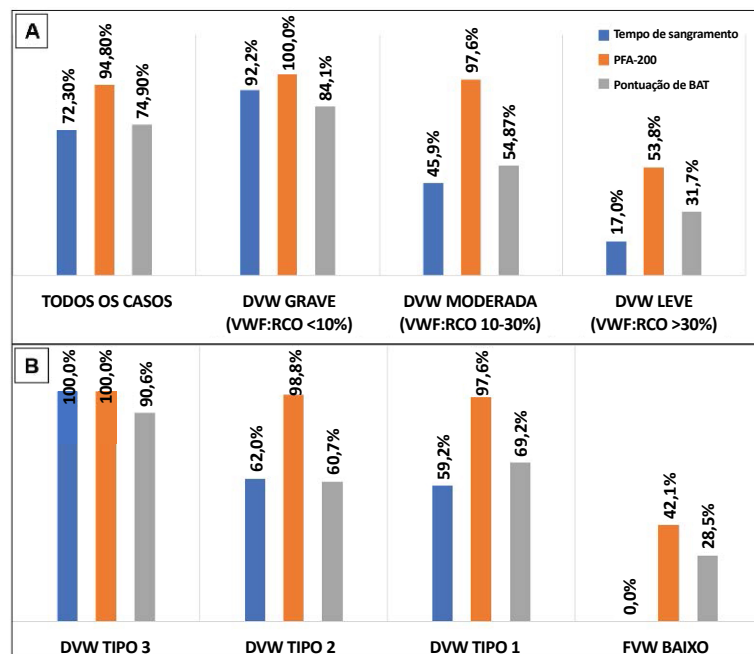


Figura 19. Sensibilidade geral do SBT e do PFA-200

Abordagem custo-efetiva para realizar ensaios de FVW: uma das principais desvantagens na realização de testes de DVW é que a maioria dos kits comerciais é cara e não acessível para a maior parte dos laboratórios em países LIC e LMIC. No entanto, muitos dos testes para DVW, como antígeno do FVW, ensaio de ligação ao colágeno e ensaios de ligação ao FVIII, também podem ser realizados por métodos internos manuais baseados em ELISA, o que reduz consideravelmente o custo. O uso de um painel minimalista composto por SBT, TTPA, FVIII, VWF:Ag e VWF:CBA pode identificar a maioria dos subtipos de DVW (exceto DVW tipo 2M) e um diagnóstico provisório de DVW pode ser feito com razoável confiança. O diagnóstico de tipo 2M requer um ensaio de atividade dependente de plaquetas, como o ensaio de cofator de ristocetina, e pode ser omitido pelo uso isolado desse painel.

O ensaio manual de cofator de ristocetina por agregometria é um teste muito trabalhoso e demorado, com falhas, alto CV e um limite de detecção muito alto. A automação do VWF:RCo melhorou significativamente seu CV e seu limite inferior de detecção. Outra vantagem da automação é o uso de volumes menores de amostras e reagentes (a ristocetina é um reagente

caro), o que reduz o custo por teste. Contudo, o uso contínuo desse teste requer encaminhamentos de pacientes e pedidos de testes suficientes. Poucos estudos foram publicados sobre o uso de métodos baseados em ELISA não comerciais para VWF:GP1bR e VWF:GP1bM, que também são opções que podem ser exploradas. No entanto, isso requer conhecimento técnico, disponibilidade de reagentes e pessoal motivado.

Como os testes manuais podem estar associados a erros, é necessário seguir medidas rigorosas de controle de qualidade, como executar testes em duplicata ou triplicata em execuções de ELISA, analisar amostras normais (PNP) e anormais em paralelo a cada execução e participar de programa de EQAS para garantir a exatidão dos resultados.

Recentemente, o *National Institute of Immunohematology* (NIIH) [Instituto Nacional de Imuno-hematologia] do *Indian Council of Medical Research* (ICMR) [Conselho Indiano de Pesquisa Médica], em Mumbai, desenvolveu um dispositivo portátil baseado em cartão para o diagnóstico de DVW grave e hemofilia grave/moderada com níveis de FVIII e FVV menores que 5 UI/dL. Trata-se de um teste rápido e custo-efetivo que pode ser utilizado em áreas de abrangência para o diagnóstico provisório de hemofilia A grave/moderada e DVW tipo 3. Atualmente, o dispositivo aguarda estudos de validação antes de ser comercializado.

Conclusão: estima-se que 80% dos casos de DVW sejam provenientes de países em desenvolvimento. Em muitos países LIC e LMIC, mais de 99% dos casos de DVW não são identificados e/ou notificados. Diretrizes aplicáveis ao restante do mundo podem não ser apropriadas nesse contexto em razão da falta de reagentes, centros de treinamento e infraestrutura laboratorial. O primeiro passo para melhorar a notificação de casos é aumentar o conhecimento sobre o uso de ferramentas simples, desde o uso de BATs para identificar pacientes com possíveis distúrbios hemorrágicos até a triagem de pacientes suspeitos por meio de testes facilmente disponíveis, como SBT e TTPA. Testes adicionais podem ser realizados com o uso de testes de antígeno do FVV baseado em ELISA e/ou de CBA, ou encaminhados a um centro terciário para testes mais especializados, sempre que possível.

Referências

- Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: Age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Baker P, Platton S, Gibson C, Gray E, Jennings I, Murphy P, Laffan M. Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 347-362.
- Balluet R, Bourguignon A, Geay-Baillat MO, Le Quellec S. [Discrepancies in FVII:C levels depending on the thromboplastin: About a case]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2020; 78(2): 198-200.
- Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H, Westhofen P, Stufano F, Goodeve A, Kitchen S, Makris M. Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydragel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. *Res Pract Thromb Haemost* 2018; 2(4): 790-799.
- Casonato A, Galletta E, Sarolo L, Daidone V. Type 2N von Willebrand disease: Characterization and diagnostic difficulties. *Haemophilia* 2018; 24(1): 134-140.
- Casonato A, Pontara E, Zerbini P, Zucchetto A, Girolami A. The evaluation of factor VIII binding activity of von Willebrand factor by means of an ELISA method: Significance and practical implications. *Am J Clin Pathol* 1998; 109(3): 347-352.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of coagulation factor activities using the one-stage clotting assay, 2nd edition. CLSI standard H48. 2016. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h48/>.
- Di Felice G, Vidali M, Parisi G, Pezzi S, Di Pede A, Deidda G, D'Agostini M, Carletti M, Ceccarelli S, Porzio O. Reference intervals for coagulation parameters in developmental hemostasis from infancy to adolescence. *Diagnostics (Basel)* 2022; 12(10): 2552.
- Durda MA, Wolberg AS, Kerlin BA. State of the art in factor XIII laboratory assessment. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(6): 700-704.

Favaloro EJ. Collagen binding assay for von Willebrand factor (VWF:CBA): Detection of von Willebrand's disease (VWD), and discrimination of VWD subtypes, depends on collagen source. *Thromb Haemost* 2000; 83(1): 127-135.

Favaloro EJ. Clinical utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 2008; 34(8): 709-733.

Favaloro EJ. Von Willebrand disease: Local diagnosis and management of a globally distributed bleeding disorder. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 440-455.

Favaloro EJ. Utility of the von Willebrand factor collagen binding assay in the diagnosis of von Willebrand disease. *Am J Hematol* 2017; 92(1): 114-118.

Favaloro EJ. The role of the von Willebrand factor collagen-binding assay (VWF:CB) in the diagnosis and treatment of von Willebrand disease (VWD) and way beyond: A comprehensive 36-year history. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(1): 43-80.

Favaloro EJ, Dean E, Arunachalam S. Evaluating performance of contemporary and historical von Willebrand factor (VWF) assays in the laboratory identification of von Willebrand disease (VWD): The Australasian experience. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 711-731.

Favaloro EJ, Pasalic L. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease in the age of the new guidelines: Considerations based on geography and resources. *Res Pract Thromb Haemost* 2023; 7(5): 102143.

Federici AB, Bucciarelli P, Castaman G, Mazzucconi MG, Morfini M, Rocino A, Schiavoni M, Peyvandi F, Rodeghiero F, Mannucci PM. The bleeding score predicts clinical outcomes and replacement therapy in adults with von Willebrand disease. *Blood* 2014; 123(26): 4037-4044.

Flood VH, Gill JC, Friedman KD, Christopherson PA, Jacobi PM, Hoffmann RG, Montgomery RR, Haberichter SL. Collagen binding provides a sensitive screen for variant von Willebrand disease. *Clin Chem* 2013; 59(4): 684-691.

Fogarty H, Doherty D, O'Donnell JS. New developments in von Willebrand disease. *Br J Haematol* 2020; 191(3): 329-339.

Fu M, Liu J, Xing J, Dai Y, Ding Y, Dong K, Zhang X, Yuan E. Reference intervals for coagulation parameters in non-pregnant and pregnant women. *Sci Rep* 2022; 12(1): 1519.

James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv* 2021; 5(1): 280-300.

Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.

Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.

Kujovich JL. Coagulopathy in liver disease: A balancing act. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2015; 2015: 243-249.

Laffan MA, Lester W, O'Donnell JS, Will A, Tait RC, Goodeve A, Millar CM, Keeling DM. The diagnosis and management of von Willebrand disease: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors Organization guideline approved by the British Committee for Standards in Haematology. *British J Haematol* 2014; 167(4): 453-465.

Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood* 2018; 131(17): 1903-1909.

Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.

Nair SC, Viswabandya A, Srivastava A. Diagnosis and management of von Willebrand disease: A developing country perspective. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37(5): 587-594.

Nesbitt IM, Goodeve AC, Guilliatt AM, Makris M, Preston FE, Peake IR. Characterisation of type 2N von Willebrand disease using phenotypic and molecular techniques. *Thromb Haemost* 1996; 75(6): 959-964.

Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: Diagnosis and treatment. *Blood* 2015; 125(13): 2052-2061.

Platton S, Baker P, Bowyer A, Keenan C, Lawrence C, Lester W, Riddell A, Sutherland M. Guideline for laboratory diagnosis and monitoring of von Willebrand disease: A joint guideline from the United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organisation and the British Society for Haematology. *Br J Haematol* 2024; 204(5): 1714-1731.

Rodgers SE, Lerda NV, Favaloro EJ, Duncan EM, Casey GJ, Quinn DM, Hertzberg M, Lloyd JV. Identification of von Willebrand disease type 2N (Normandy) in Australia: A cross-laboratory investigation using different methods. *Am J Clin Pathol* 2002; 118(2): 269-276.

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E, Bochkov N, Boulyjenkov V, Ginsburg D, Meyer D, Peake I, Rodeghiero F, Srivastava A. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2000; 84(2): 160-174.

Salazar E, Long TA, Smock KJ, Wool GD, Rollins-Raval M, Chen D et al. Analysis of College of American Pathologists von Willebrand Factor Proficiency Testing Program. *Semin Thromb Hemost* 2022; 48(6): 690-699.

Seidzadeh O, Peyvandi F, Mannucci PM. Von Willebrand disease type 2N: An update. *J Thromb Haemost* 2021; 19(4): 909-916.

Sevenet PO, Kaczor DA, Depasse F. Factor VII deficiency: From basics to clinical laboratory diagnosis and patient management. *Clin Appl Thromb Hemost* 2017; 23(7): 703-710.

Srivastava A, Rodeghiero F. Epidemiology of von Willebrand disease in developing countries. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(5): 569-576.

Stonebraker JS, Iorio A, Lavin M, Rezende SM, Srivastava A, Pierce GF, Coffin D, Tootoonchian E, Makris M. Reported prevalence of von Willebrand disease worldwide in relation to income classification. *Haemophilia* 2023; 29(4): 975-986.

Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Pooter N. Age dependency for coagulation parameters in paediatric populations. Results of a multicentre study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016; 116(1): 9-16.

Vangenechten I, Mayger K, Smejkal P, Zapletal O, Michiels JJ, Moore GW, Gadisseur A. A comparative analysis of different automated von Willebrand factor glycoprotein Ib-binding activity assays in well typed von willebrand disease patients. *J Thromb Haemost* 2018; 16(7): 1268-1277.

Wakeman L, Munro R, Dorward N, Benton A, Gibb A, Al-Ismaïl S. New coagulation assays reference ranges for healthy adults using the modern Sysmex CA-1500 Coagulometer. *Blood* 2005; 106(11): 4025.

Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-236.

Zheng C, Zhang B. Combined deficiency of coagulation factors V and VIII: An update. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(6): 613-620.

Zhao Y, Feng G, Feng L. Effects of pre-analytical storage time, temperature, and freeze-thaw times on coagulation factors activities in citrate-anticoagulated plasma. *Ann Transl Med* 2018; 6(23): 456.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Ensaios Baseados em TP (Ensaio de Um Estágio de FII, V, VII e X)
- ✓ Ensaios Baseados em TTPA (Ensaio de Um Estágio de FXI, FXII, PKK ou HMWK)
- ✓ Fator XIII: Triagem, Atividade e Antígeno

Ensaios Baseados em TP (Ensaio de Um Estágio de FII, V, VII e X): deficiências dos fatores de coagulação II, V, VII ou X são distúrbios hemorrágicos raros (Mumford et al, 2014). Os ensaios de atividade dos fatores II, V, VII ou X podem ser realizados usando um ensaio de um estágio baseado em TP. O ensaio compara a capacidade de diluições de um plasma padrão ou de referência e plasma de teste para corrigir o TP de um plasma conhecido por ser totalmente deficiente no fator de coagulação que está sendo medido. No ensaio de FV, por exemplo (descrito abaixo), o plasma é deficiente em FV, mas contém quantidades normais de todos os outros fatores de coagulação, incluindo II, VII, X e fibrinogênio. Os fatores de coagulação II, VII e X podem ser testados de forma semelhante, substituindo o plasma deficiente em FV no exemplo dado abaixo pelo plasma deficiente correspondente e usando um plasma de referência (padrão) com concentração conhecida do fator que está sendo testado (Baker et al, 2020).

Reagentes:

- ✓ Plasma deficiente em FV. Pode ser congênita ou artificialmente deficiente em FV (plasma envelhecido).
- ✓ Tampão veronal de Owren (OVb).
- ✓ Plasma de teste citratado pobre em plaquetas.
- ✓ Para o padrão, é preferível um plasma de referência (padrão) comercial ou, se indisponível, um pool de plasma normal pobre em plaquetas de 20 doadores (mantido a -70°C ou menos).
- ✓ Plasma de controle de qualidade interno - comercial ou de origem local (CLSI, 2016).
- ✓ Reagente de tromboplastina que deve conter cloreto de cálcio. A melhor prática é usar a mesma tromboplastina usada no teste de TP, mas uma tromboplastina alternativa pode ser usada para o diagnóstico de pacientes incomuns.

Método: decante reagente de tromboplastina suficiente em um tubo de vidro de 75 x 12 mm. Deixar aquecer a 37°C por 5 minutos. Se o reagente de tromboplastina não contiver cálcio, este deverá ser adicionado separadamente. Decante CaCl_2 M/40 suficiente em um tubo de vidro de 75 x 12 mm. Deixar aquecer a 37°C por 5 minutos. Para os dois testes, CQ e plasmas padrão, preparar as diluições em tubos plásticos, conforme mostrado na Tabela 32.

Tabela 32. Preparação de diluições de plasma de teste, CQ e padrão para ensaios de um estágio de FII, FV, FVII e FX

Diluição	Plasma (mL)	OVb (mL)
1/5	0,1	0,4
1/10	0,1	0,9
1/20	0,5 (diluição 1/10)	0,5
1/40	0,5 (diluição 1/20)	0,5

Observação: misture bem a diluição 1/10 antes de usá-la para preparar a diluição 1/20. Misture bem a diluição 1/20 antes de usá-la para preparar a diluição 1/40. As diluições de plasma devem ser testadas imediatamente após a preparação. Se a temperatura ambiente exceder 25°C, pode ser necessário manter as diluições em gelo derretido antes da análise.

Teste cada diluição do plasma de referência (padrão/calibrador) da seguinte forma:

- ✓ Pipete 0,1 mL da diluição 1/10 para um tubo de vidro de 75 x 10 mm.
- ✓ Adicione 0,1 mL de plasma deficiente em FV.
- ✓ Aqueça a 37°C por 2 minutos.
- ✓ Adicione 0,2 mL de reagente de tromboplastina pré-aquecido.
- ✓ Acione o cronômetro e misture.

Observação: se o reagente de tromboplastina não contiver cálcio, 0,1 mL de tromboplastina é adicionado à mistura de diluição e plasma deficiente. Após um intervalo de 1 a 2 minutos para aquecimento a 37°C, a mistura é coagulada com 0,1 mL de cálcio pré-aquecido (a 37°C).

Registre o tempo de coagulação:

- Repita a diluição 1/10 e, em seguida, teste as diluições 1/20 e 1/40 em duplicata.
- Repita as diluições do plasma de teste e de CQ. Teste em duplicata.
- Para plasmas de teste que devem ser normais, teste as diluições 1/10, 1/20 e 1/40. Para plasmas de teste que devem ter níveis reduzidos, teste as diluições 1/5, 1/10 e 1/20.
- Um "branco" também deve ser testado da seguinte forma:
 - 0,1 mL de OVB
 - 0,1 mL de plasma deficiente em FV
 - 0,2 mL de reagente de tromboplastina/cálcio
- O tempo de coagulação do "branco" reflete a qualidade do plasma deficiente e deve ser equivalente a menos de 1 UI/dL (<0,01 UI/mL).

Resultados: calcule a média de cada resultado duplicado. Os tempos das duplicatas devem estar dentro de 10% entre si para serem aceitáveis. Em papel logarítmico de 3 ciclos x 2 ciclos, plote os tempos de coagulação dos plasmas de referência, teste e CQ em relação à concentração percentual de FV. A diluição 1/10 recebe arbitrariamente o valor de 100%, portanto, a diluição 1/20 equivale a 50%, 1/40 a 25% e 1/5 a 200%. Como alternativa, plote a concentração em escala logarítmica e o tempo de coagulação em escala linear. A quantidade relativa de FV no plasma de teste em comparação com o plasma de referência é extrapolada a partir dos gráficos. Um exemplo disso é mostrado na seção sobre ensaios baseados em TTPA. O tempo de coagulação equivalente a 100% do teste (o ponto onde a linha de teste passa pela atividade de 100%) é lido a partir da linha padrão (portanto, a concentração do padrão que poderia fornecer aquele tempo de coagulação específico). Isso resulta na concentração do teste em porcentagem do padrão. Essa porcentagem é multiplicada pelo valor da concentração do fator de coagulação no plasma padrão (em UI/dL) para obter a concentração no teste (em UI/dL).

Observações: baixos níveis de atividade de FII, FV, FVII ou FX podem ser medidos em pacientes com doença hepática (Kujovich et al, 2015). A faixa de referência de cada um desses fatores de coagulação para adultos deve ser determinada localmente, mas frequentemente tem limite inferior de 50–70 UI/dL para FV, FVII e FX. O limite inferior de referência para FII é maior (Appel et al, 2012; Wakeman et al, 2005). A atividade de FVII pode aumentar durante a gravidez (Fu et al, 2022). Indivíduos com nível reduzido de FV também devem fazer um ensaio de atividade de FVIII para excluir deficiência combinada de FV e FVIII (Zheng et al, 2013). Os fatores II, VII e X dependentes de vitamina K podem ser naturalmente reduzidos ao nascimento, aumentando ao longo da infância até atingir os níveis de adultos. Faixas de referência para crianças podem ser estabelecidas localmente ou obtidas da literatura, levando-se em consideração a variação dos reagentes (Toulon et al, 2016; Attard et al, 2013; Di Felice et al, 2022). Em alguns casos de deficiência de FVII (FVII Padua, FVII Nagoya, FVII Tondabayashi/Shinjo), pode haver discrepância entre os níveis de FVII:C obtidos, dependendo da fonte de tromboplastina. Portanto, o uso de tromboplastina humana é aconselhável visto que os resultados têm maior probabilidade de refletir a atividade *in vivo*. Em alguns casos raros, o resultado pode ser muito baixo se for utilizada tromboplastina de coelho, mas mais alto ou normal se o ensaio utilizar tromboplastina humana ou de cérebro de boi. Esse pode ser o motivo pelo qual alguns casos de deficiência aparentemente grave de FVII não apresentam sintomas de sangramento (Balluet et al, 2020; Sevenet et al, 2017).

Ensaio Baseado em TTPA (Ensaio de Um Estágio de FXI, FXII, PKK ou HMWK): a deficiência de FXI é um distúrbio hemorrágico raro (Mumford et al, 2014), enquanto deficiências dos fatores de contato FXII, PKK e HMWK não estão associadas a sangramento (Maas et al, 2018), mas causam TTPA significativamente prolongado. O ensaio de coagulação baseado em TTPA de um estágio para FXI é descrito nesta seção. O ensaio se baseia na comparação da capacidade de diluições de plasmas padrão e de teste para corrigir o TTPA de um plasma conhecido por ser totalmente deficiente em FXI, mas que contém todos os outros fatores necessários para a coagulação normal. Para os fatores FXII, PKK e HMWK, o ensaio é essencialmente o mesmo que o do FXI de um estágio, mas é realizado pela substituição do plasma deficiente relevante pelo plasma deficiente em FXI e pela seleção do plasma de referência apropriado. O reagente de TTPA utilizado no ensaio de PKK não pode usar ácido elágico como ativador.

Reagentes:

- ✓ Plasma de teste citratado pobre em plaquetas.
- ✓ Plasma padrão (de referência).
- ✓ O plasma padrão (de referência/calibrador) utilizado deve ser um pool de plasma preparado localmente e mantido a -40°C ou menos, ou um plasma padrão comercial. Em ambos os casos, esse plasma de referência deve ser calibrado para o ensaio de coagulação de FXI de acordo com o padrão internacional vigente para FXI no plasma. Não é aceitável presumir que um pool de plasma normal tenha atividade de FXI de 100 UI/dL.

Plasma de controle de qualidade interno (Baker et al, 2020):

- ✓ Plasma deficiente em FXI.
- ✓ Disponível comercialmente ou pode ser coletado de um doador com deficiência grave nas seguintes condições.
- ✓ Nível de FXI menor que 1 UI/dL, sem histórico de anticorpos anti-FXI, sem tratamento por 2 semanas, incluindo testes de função hepática normais.
- ✓ Função hepática anormal pode ocasionar redução de outros fatores de coagulação, o que afeta a especificidade do ensaio. Esse plasma pode ser armazenado em alíquotas a -20°C ou menos por aproximadamente 3 meses (Zhao et al, 2018; Woodhams et al, 2001).
- ✓ É preferível utilizar plasma deficiente em FXI produzido por imunodepleção de FXI de plasma normal utilizando um anticorpo monoclonal. Esse tipo de material está disponível comercialmente e tem a vantagem de maior segurança viral em comparação com o plasma proveniente de pacientes que foram tratados com produtos derivados de plasma.
- ✓ Contudo, nem todos os plasmas imunodepletados são <1 UI/dL, e é preciso ter cuidado ao verificar isso antes do uso.
- ✓ Reagente de TTPA sensível a deficiências de fatores (CLSI, 2016). Observe que os reagentes de TTPA ativados por ácido elágico são insensíveis à deficiência de PKK.
- ✓ Solução salina tamponada de Owren (OBS ou tampão glioxalina).
- ✓ CaCl₂ 25 mM (observe que o CaCl₂ da Werfen fornecido com SynthASil é 20 mM).

Método:

- ✓ **Para FXI, FXII e HMWK:** faça diluições 1/10 de plasma padrão, de CQ e de teste em solução salina tamponada, em tubos plásticos (se for esperado que o plasma de teste tenha um nível muito baixo de fator, comece com uma diluição 1/5). Usando volumes de 0,2 mL, faça diluições duplas em OBS de plasma padrão, de CQ e de teste, de 1/10 a 1/40, em tubos plásticos (misture bem cada diluição antes de transferir para o próximo tubo.) As diluições de plasma devem ser testadas imediatamente após a preparação. Se a temperatura ambiente exceder 25°C, pode ser necessário manter as diluições em gelo úmido antes do teste.
- ✓ **Somente para PKK:** diluições maiores de 1/100, 1/200 e 1/400 são geralmente necessárias. Teste o plasma padrão primeiro. Pipete 0,1 mL de cada diluição do padrão em um tubo de vidro de 75 x 10 mm. Adicione 0,1 mL de plasma deficiente em FXI, misture e transfira para um banho-maria a 37°C. Adicione 0,1 mL de reagente de TTPA, misture e incube por 2-5 minutos, dependendo do tempo de incubação recomendado para o reagente de TTPA. Ao final do tempo de incubação, adicione 0,1 mL de CaCl₂, misture e incline

o tubo até que um coágulo seja visível. Registre o tempo de coagulação. Repita as etapas 4-7 usando o plasma de CQ e depois o plasma de teste. Um "branco" também deve ser preparado utilizando 0,1 mL de OBS no lugar do plasma de teste. O tempo de coagulação do branco deve ser maior que o tempo de 1% de atividade de FXI do padrão lido no gráfico de calibração. Se o tempo for menor, isso indica que o plasma deficiente não é totalmente deficiente em FXI e, portanto, não é um plasma substrato adequado.

Resultados: a representação gráfica dos resultados é igual à dos ensaios baseados em TP (descritos acima) e requer papel milimetrado com escala logarítmica dupla ou logarítmica/linear. Para FXI, FXII e HMWK, a diluição 1/10 recebe arbitrariamente o valor de 100%, a diluição 1/20, o valor de 50%, e a diluição 1/40, o valor de 25%. Se utilizada, a diluição 1/5 tem o valor de 200%. Para PKK, a diluição 1/100 recebe arbitrariamente o valor de 100%, a diluição 1/200, o valor de 50%, e a diluição 1/400, o valor de 25%. Se utilizada, a diluição 1/50 tem o valor de 200%. Linhas retas, paralelas entre si, devem ser obtidas. Leia a concentração do CQ e da amostra de teste como nos ensaios baseados em TP (descritos acima). Nesse exemplo, a concentração de FXI na amostra de teste é 7% daquela no padrão. Se o padrão tiver uma concentração de 85 UI/dL, o cálculo é $85 \text{ UI/dL} \times 7\% =$ a amostra de teste tem concentração de 6 UI/dL. Se as linhas não forem paralelas, o ensaio deve ser repetido. Verifique os tempos de coagulação da amostra de teste. Se forem muito longos, teste uma diluição 1/5 (ou 1/50 para PKK). Linhas não paralelas podem ocorrer devido a erro técnico. Se o erro técnico tiver sido eliminado, pode ser devido à presença de um inibidor, que pode agir especificamente contra o FXI ou pode ser do "tipo lúpico", apresentando um padrão convergente. Linhas divergentes são típicas de uma amostra ativada (Baker et al, 2020).

Observações: deficiências de FXII, PKK ou HMWK não estão associadas a risco aumentado de sangramento. Os reagentes de TTPA ativados por ácido elágico são insensíveis à deficiência de PKK. Se a concentração de FXI, FXII, PKK ou HMWK no plasma de teste for próxima de zero (ou seja, os tempos de coagulação de todas as diluições forem semelhantes ao branco), podem ocorrer linhas não paralelas. A faixa de referência normal deve ser estabelecida localmente, mas frequentemente tem limite inferior de 50–70 UI/dL para cada um desses fatores. Unidades Internacionais já foram estabelecidas para FXI e FXII no plasma, mas não há planos de estabelecer unidades internacionais para PKK ou HMWK.

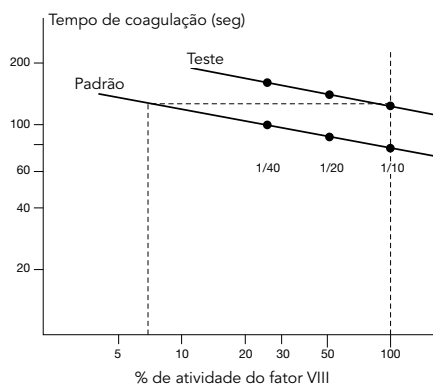


Figura 20. Gráfico do ensaio de FXI

Fator XIII (FXIII): Triagem, Atividade e Antígeno

Triagem de FXIII (testes de solubilidade do coágulo): o FXIII medeia a reticulação das cadeias α e γ de fibrina. A deficiência de FXIII é classificada como um distúrbio hemorrágico raro e pode ser causada por mutações nas subunidades catalíticas A do FXIII ou nas subunidades transportadoras B do FXIII (Karimi et al, 2018). Atualmente, testes qualitativos de solubilidade do coágulo de fibrina não são recomendados para uso em razão da falta de padronização e da baixa sensibilidade. Recomenda-se que a deficiência de FXIII seja diagnosticada por meio de um ensaio funcional de atividade do FXIII em vez de solubilidade do coágulo (Mumford et al, 2014; Palla et al, 2015; Kohler et al, 2011), mas em algumas regiões do mundo apenas ensaios de solubilidade do coágulo estão disponíveis. Testes de solubilidade do coágulo contendo ureia 5M são mais específicos do que aqueles contendo ácido acético, porém, hipofibrinogenemia e disfibrinogenemia podem causar resultados falso-positivos no teste à base de ureia (Dorgalaleh et al, 2016). Testes de

solubilidade do coágulo contendo ácido monocloroacético (MCA) a 1% são mais sensíveis e rápidos do que os testes à base de ureia (Dorgalaleh et al, 2016). Foi sugerido que os testes à base de ureia e ácido acético sejam realizados em paralelo para otimizar o diagnóstico (Dorgalaleh et al, 2016). Resultado positivo só será observado em casos de deficiência grave de FXIII, com atividade de FXIII <5-10 UI/dL, dependendo do método utilizado.

Método: trombina e cálcio são necessários para ativar o FXIII de forma que ele reticule a fibrina em uma forma estável. Nesse método, apesar do uso de plasma citratado, íons de cálcio suficientes ainda estão disponíveis para ativação do FXIII. Plasma normal anticoagulado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é usado como controle. Nesse plasma, o EDTA resulta em quelação completa dos íons de cálcio, o que significa que o FXIII não consegue reticular a fibrina. A adição de ácido acético a 2% ou ureia 5M resulta na lise de coágulos não reticulados, enquanto o plasma citratado com >10 U/dL de atividade de FXIII apresenta um coágulo insolúvel. O teste é geralmente mais sensível se for utilizado ácido acético (em vez de ureia), uma vez que o coágulo se dissolverá em níveis mais elevados de FXIII na presença de ácido acético (Jennings et al, 2003).

Materiais/reagentes:

- ✓ Tubos de vidro de 75 x 10 mm
- ✓ Solução salina a 0,9%
- ✓ Trombina 30 U/mL
- ✓ Plasma normal com EDTA
- ✓ Ácido acético a 2%

Método: adicione 0,2 mL de plasma citratado de teste a 0,2 mL de solução salina a 0,9% em um tubo de vidro. Para o controle positivo, repita com 0,2 mL de plasma com EDTA. Para o controle negativo, repita com 0,2 mL de plasma citratado normal. Adicione 0,1 mL de trombina 30 U/mL e misture. Deixe em repouso por 30 minutos a 37°C. Agite os tubos para soltar os coágulos das laterais. Adicione 5 mL de ácido acético a 2% e tampe o tubo. Deixe em temperatura ambiente por 12 horas.

Resultados: o plasma com EDTA não deve apresentar coágulo visível. O plasma citratado normal deve apresentar um coágulo intacto e visível. Se o coágulo não for visível, o indivíduo tem deficiência de FXIII.

Faixa normal: indivíduos normais apresentam um coágulo visível após 12 horas em ácido acético a 2%.

Observações: ureia 5M pode ser usada no lugar de ácido acético a 2%. O tempo de incubação para dissolução do coágulo é de 18 horas nesse caso. Este método é menos sensível, mas mais específico do que o ácido acético (descrito acima). A coagulação com cálcio e a lise com ureia produzem resultados anormais somente quando os níveis de FXIII estão abaixo de 5 U/dL. Em comparação, a coagulação com trombina 30 U/mL seguida de lise com ácido acético a 2% produz resultados anormais em níveis abaixo de 10 U/dL (Jennings et al, 2003). Ocasionalmente, pacientes com níveis de FXIII acima de 5 U/dL podem apresentar sangramento (consulte Bolton-Maggs et al, 2004 para revisão). Pacientes com hipofibrinogenemia ou afibrinogenemia devem ser excluídos dos testes por esses testes.

Ensaio de atividade do FXIII: o FXIII medeia a reticulação das cadeias α e γ de fibrina. A deficiência de FXIII é classificada como um distúrbio hemorrágico raro e pode ser causada por mutações nas subunidades catalíticas A do FXIII ou nas subunidades transportadoras B do FXIII (Karimi et al, 2018; Mumford et al, 2014). Os métodos atualmente disponíveis para diagnósticos clínicos laboratoriais de deficiência de FXIII incluem ensaios de solubilidade do coágulo, ensaios quantitativos de atividade do FXIII, ensaios de antígeno de FXIII específicos para o complexo FXIII-A2B2, FXIII-A2 ou FXIII-B2, e testes genéticos (Palla et al, 2015). Recomenda-se que a deficiência de FXIII seja diagnosticada por meio de um ensaio funcional de atividade do FXIII em vez de solubilidade do coágulo (Mumford et al, 2014; Kohler et al, 2011; Dorgalaleh et al, 2016). A maioria dos ensaios de atividade do FXIII é sensível apenas a deficiências da subunidade A do FXIII. A superfície de uma placa de microtitulação é revestida com fibrinogênio. Ligação não específica é impedida por um agente bloqueador especial. O FXIII na amostra é ativado por trombina e íons de cálcio. Na etapa de incorporação, o FXIII no plasma de teste incorpora o substrato, 5-biotinamidopentilamina (BAPA), ao substrato fibrinogênio de FXIII revestido na placa na presença de cálcio. A quantidade de BAPA incorporada é proporcional à atividade do FXIII da amostra de teste. Na etapa seguinte, um conjugado Strept-AP (estreptavidina-fosfatase alcalina) é ligado ao BAPA

incorporado. A fosfatase alcalina converte o substrato sintético pNPP (p-nitrofenil fosfato) em fosfato e p-nitrofenol, que podem ser medidos a 405 nm. Os reagentes para o método descrito abaixo estão disponíveis comercialmente na forma de kit (Pefakit ensaio de incorporação de FXIII, Pentapharm, Suíça). Observe que estão disponíveis outros ensaios de atividade de outros fabricantes, incluindo o kit Berichrom FXIII (Siemens, Marburg, Alemanha) para liberação de amônia e o ensaio fluorogênico de atividade do FXIII Technoflur (Technoclone, Viena, Áustria).

Reagentes: todos os reagentes necessários estão incluídos no kit comercial.

Método:

Dia 1

- ✓ Deixe os componentes do kit atingirem a temperatura ambiente por 30 minutos.
- ✓ Reconstitua o reagente de revestimento (R2) em água destilada, de acordo com o volume recomendado pelo fabricante.
- ✓ Adicione 100 µL de reagente de revestimento por poço aos poços vazios das tiras da placa de microtitulação.
- ✓ Congele o excesso de reagente de revestimento para uso posterior. Ele permanece estável por 6 meses a -20°C.
- ✓ Sele as tiras com o lacre plástico fornecido e incube durante a noite (14 a 16 horas) em temperaturas de 20–25°C.

Dia 2

- ✓ Dilua 50 mL de TBS R1 (solução salina tamponada com tris) concentrado 20x em 950 mL de água destilada ou em um volume menor, se necessário.
- ✓ Dilua 3 mL do reagente de bloqueio R3 com 27 mL de TBS R1 diluído. Congele o excesso de R3.
- ✓ Descarte o reagente de revestimento da placa de microtitulação, inverta a tira e bata levemente no tecido para remover os resíduos.
- ✓ Adicione 300 µL de reagente de bloqueio diluído a cada poço.
- ✓ Incube por 1-1,5 horas a 37°C em uma incubadora.
- ✓ Reconstitua o calibrador R10 em 0,5 mL de água destilada e os três controles, R11, R12 e R13, em 0,2 mL de água destilada.
- ✓ Descongele os plasmas de teste congelados a 37°C por 5 minutos antes da análise.
- ✓ Prepare um recipiente com algumas centenas de mL de uma mistura de gelo/água como banho de gelo.
- ✓ Faça diluições de todos os plasmas de teste e controle, 10 µL de plasma e 1 mL de tampão TBS R1 diluído (diluição 1:101). Misture em vórtex.
- ✓ Faça diluições do calibrador da seguinte forma:

Cal 1: 30 µL de R10 + 970 µL de TBS R1

Cal 2: 20 µL de R10 + 980 µL de TBS R1

Cal 3: 75 µL de R10 + 25 µL de TBS R1

Cal 4: 25 µL de R10 + 75 µL de TBS R1

Cal 5: 10 µL de R10 + 90 µL de TBS R1

Observação: as diluições 1 e 2 estão prontas para uso. Dilua ainda mais 10 µL das diluições dos calibradores 3–5 em 1 mL de TBS R1. Lave a placa três vezes com 300 µL/poço de TBS R1. Inverta e bata levemente no tecido para remover o excesso de líquido. Reconstitua o reagente ativador parte A (R4) e parte B (R5) em 5 mL de água destilada cada. Mantenha em banho de gelo derretido/água gelada por no máximo 30 minutos. Adicione 25 µL cada de plasma calibrador, de controle ou teste nos poços apropriados. Inclua um branco de TBS R1. Misture os reagentes ativadores parte A e B (R4 e R5) para formar o reagente de incorporação final. Adicione 75 µL do reagente de incorporação final a cada poço, inclusive ao poço do branco. Incube por 30 minutos a 37°C na incubadora. Adicione 200 µL/poço de solução de interrupção da incorporação R6. Misture delicadamente por 10 minutos no agitador de placas. Reconstitua o reagente de detecção R7 adicionando 12 mL de água destilada. Congele o R7 diluído não utilizado. Lave a placa

quatro vezes com 300 µL/poço de TBS. Retire o excesso de líquido. Adicione 100 µL/poço de reagente de detecção R7. Incube por 15 minutos a 37°C na incubadora. Lave a placa quatro vezes com 300 µL/poço de TBS. Retire o excesso de líquido. Prepare a solução de substrato imediatamente antes do uso:

- ✓ Para 96 poços (placa inteira), adicione 9 comprimidos R8b a 22,5 mL de tampão dietanolamina R8a
- ✓ Para 64 poços (8 tiras), adicione 6 comprimidos a 15 mL de dietanolamina
- ✓ Para 32 poços (4 tiras), adicione 3 comprimidos a 7,5 mL de dietanolamina
- ✓ Para 24 poços (3 tiras), adicione 2 comprimidos a 5 mL de dietanolamina

Adicione 180 µL/poço de solução de substrato. Incube por 11 minutos a 37°C na incubadora. Adicione 50 µL/poço de solução de interrupção (NaOH 4M) R9. Leia as densidades ópticas em 15 minutos a 405 nm em um leitor de placas de microtitulação.

Observação: vários reagentes do kit podem ser armazenados congelados para uso posterior, conforme descrito acima. No entanto, o substrato, o reagente ativador partes A e B, os calibradores e os controles não devem ser congelados. Kits de reagentes parciais contendo esses materiais podem ser adquiridos para uso com quaisquer reagentes parcialmente usados que tenham sido congelados. Isso reduz o custo por teste se as amostras de teste forem analisadas em pequenos lotes.

Cálculo dos resultados: as diluições dos calibradores e os valores de controle são fornecidos com cada kit. Utilizando um software de tratamento de dados adequado ou papel milimetrado, construa uma curva de calibração plotando a concentração em relação à densidade óptica (DO) das diluições dos calibradores após subtrair a DO do branco. Utilize uma escala linear-linear. Subtraia a DO do branco das DOs das diluições da amostra de teste/controle e converta as DOs em atividade do FXIII, utilizando a curva de calibração. Os resultados do paciente podem ser aceitos se os valores da amostra de controle estiverem dentro da faixa aceitável.

Referências

- Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini S, Shamsizadeh M. Guidelines for laboratory diagnosis of factor XIII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2016; 27(4): 361-364.
- Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini MS, Farshi Y, Roshanzamir F, Naderi M, Kazemi A, Zaker F, Aghideh AN, Shamsizadeh M. Diagnosis of factor XIII deficiency. *Hematology* 2016; 21(7): 430-439.
- Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: A UK NEGAS study. *J Thromb Haemost* 2003; 1(12): 2603-2608.
- Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.
- Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.
- Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.
- Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: Diagnosis and treatment. *Blood* 2015; 125(13): 2052-2061.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Contagem de Plaquetas
 - ✓ Teste de Função Plaquetária
 - ✓ Teste de Função Plaquetária por Citometria de Fluxo
-

Contagem de Plaquetas: o sangue é misturado a um diluente que causa hemólise das hemácias. O hemocítmetro é preenchido com líquido diluente e as plaquetas são contadas no microscópio, de preferência com contraste de fase, se disponível.

Materiais/equipamentos:

- ✓ Câmara de contagem fina e de fundo plano (hemocítmetro de contraste de fase com marcação Neubauer)
- ✓ Microscópio de contraste de fase equipado com condensador de longa distância de trabalho, se disponível; caso contrário, um microscópio óptico comum
- ✓ Pipeta de 20 µL
- ✓ Pipeta graduada de 2 mL
- ✓ Tubo de 12 x 75 mm
- ✓ Misturador mecânico

Reagente: líquido diluente: oxalato de amônio 1% em água destilada. Mantenha no refrigerador e sempre filtre imediatamente antes de usar.

Amostra: se a amostra de sangue for de picada no dedo, a punção deve estar limpa e o sangue fluindo livremente. Limpe a primeira gota de sangue. Se a amostra de sangue for de sangue venoso, ela deve ser coletada em seringa de plástico seco (ou vidro siliconizado) com agulha curta de calibre não inferior a 21. A agulha deve ser removida antes que o sangue seja transferido para um recipiente plástico com EDTA. O sangue e o anticoagulante devem ser misturados suavemente, para evitar a formação de espuma, sem demora.

Método: pipete 0,38 mL de líquido diluente em um tubo de ensaio. Encha a pipeta de 20 µL até a marca e limpe a parte externa dela. Despeje o conteúdo da pipeta no líquido diluente e lave a pipeta aspirando o sangue e despejando-o no tubo algumas vezes. Misture por pelo menos 10 minutos manualmente ou, de preferência, com um misturador mecânico. Encha o hemocítmetro conforme descrito abaixo. Cubra a câmara com uma placa de Petri por 10 a 20 minutos para permitir que as plaquetas se decantem. Deixe um pedaço de algodão úmido ou papel de filtro na placa para evitar a evaporação. Usando um microscópio, conte as plaquetas nos quadrados grandes de 1 mm (= 0,1 µL). Conte as plaquetas em quantos quadrados forem necessários para atingir uma contagem de pelo menos 100. As plaquetas parecem redondas ou ovais, e sua estrutura granular interna e brilho púrpura permitem que sejam distinguidas de detritos. Hemácias fantasmas que foram lisadas pelo oxalato de amônio são vistas ao fundo. Se o contraste de fase não estiver disponível, um microscópio óptico comum pode ser usado, desde que o condensador seja reduzido para fornecer baixa intensidade de luz. Calcule o número de plaquetas por litro de sangue de acordo com a fórmula abaixo.

Hemocítmetro: a câmara de contagem do hemocítmetro, com marcação Neubauer ou Neubauer aprimorada, é construída de forma que a distância entre a parte inferior da lamínula e a superfície da câmara seja de 0,1 mm. A superfície da câmara contém duas áreas com marcações especiais, com dimensões mostradas na Figura 21. O 1 mm² central possui linhas de contorno duplas ou triplas. Nas áreas centrais, há 25 quadrados na marcação Neubauer

aprimorada e 16 quadrados na marcação Neubauer. Cada quadrado tem uma área de 0,04 mm² (0,2 x 0,2 mm). Esses quadrados são, por sua vez, divididos em quadrados menores, cada um com 0,0025 mm² (0,05 x 0,05 mm). Os quadrantes externos da área demarcada têm 1 mm² cada e são divididos em 16 quadrados.

Cálculos:

A fórmula para calcular a contagem de células é:

$$\text{Contagem (células/L)} = N \times D/A \times 10 \times 10^6$$

Onde N = número total de células contadas

D = diluição

A = área total contada (em mm²)

10 = fator para calcular o volume em µL a partir da área (em mm²) e da profundidade da câmara (0,1 mm)

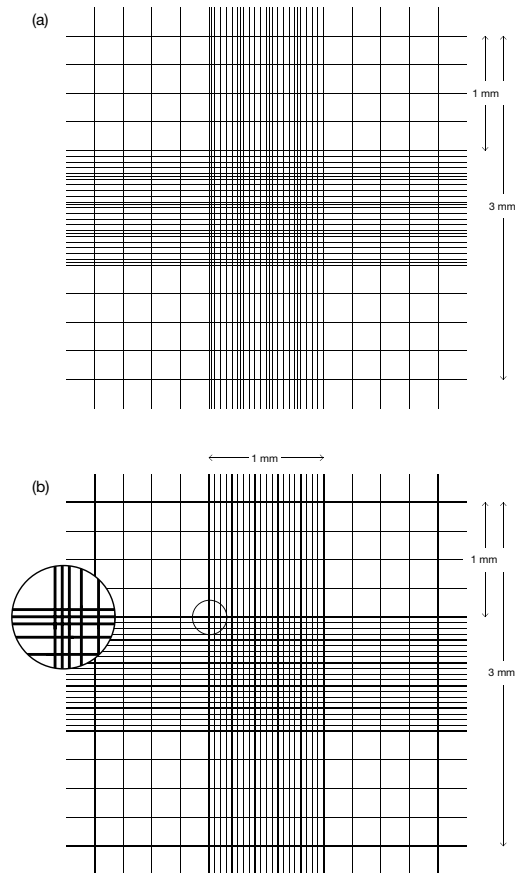
10⁶ = fator para converter contagem/µL em contagem/L

Fontes de erro na contagem de células: quando se utiliza sangue capilar, deve-se obter uma gota fluida. Quando se utiliza sangue anticoagulado, a amostra deve ser cuidadosamente misturada, invertendo o tubo de sangue pelo menos 20 vezes antes da coleta. Não agite o tubo, pois a agitação produz espuma, o que impossibilita a pipetagem exata. Incline o tubo bem misturado em um ângulo de 45° ou um pouco mais e pipete pela borda do tubo, seguindo os mesmos procedimentos usados para o sangue capilar. As pipetas para coleta de sangue devem estar limpas e secas. A pipeta deve ser enchida rapidamente e o sangue deve ser coletado com exatidão, utilizando um dispositivo de sucção acoplado à pipeta, até a linha desejada. Se a linha for ligeiramente ultrapassada, o excesso de sangue pode ser eliminado encostando a borda da pipeta em um pedaço de papel de filtro ou lenço de papel macio. Se a linha for ultrapassada, uma nova pipeta deve ser usada. Não deve haver bolhas de ar na coluna de sangue. A parte externa da pipeta deve ser limpa para remover o sangue (com cuidado para não puxar sangue pela ponta) antes de ser introduzida no líquido diluente. Depois que o conteúdo da pipeta for despejado no diluente, o líquido diluente deve ser aspirado para dentro da pipeta com sucção constante várias vezes, para garantir que todo o sangue seja despejado no líquido. O tubo com o sangue diluído deve ser agitado suavemente por pelo menos dois minutos manualmente ou, de preferência, em um agitador mecânico. Após a agitação do tubo, a câmara é imediatamente preenchida com uma pipeta Pasteur ou tubo capilar. A câmara é preenchida por capilaridade, com o fluxo de líquido da pipeta ou capilar regulado para que preencha de forma rápida e suave. A câmara deve ser preenchida completamente, mas o líquido não deve transbordar para os canais. Deixe as células repousarem na área de contagem por 10 a 20 minutos e, em seguida, prossiga com a contagem. A câmara do hemocitômetro e a tampa de vidro devem estar limpas e secas antes do uso. Erros importantes podem ser causados por impressões digitais ou por uma película oleosa. Um número suficiente de células deve ser contado para reduzir o erro decorrente da distribuição aleatória das células. Na prática, pelo menos 100 células devem ser contadas. Como verificação adicional da distribuição correta das células na câmara, o número de células contadas em cada área (ou seja, nos quadrados grandes) não deve diferir em mais de 10%.

Controles: duas diluições devem ser feitas e a média das duas contagens deve ser obtida; as duas contagens devem concordar em até 10%.

Fontes de erro na contagem de plaquetas: o sangue obtido por punção venosa é preferível ao sangue capilar, pois as plaquetas aderem à ferida e as diluições sucessivas a partir de uma picada no dedo nem sempre são reprodutíveis. Os erros gerais de pipetagem e hemocimetria são descritos acima. Além disso, deve-se prestar atenção especial à limpeza rigorosa da câmara de contagem, pois sujeira e detritos podem ser contados como

plaquetas. Lave a câmara com água e sabão, enxágue com água destilada, deixe escorrer e seque com um pano sem fiapos. Certifique-se de que a lamínula esteja limpa antes de usá-la. A presença de aglomerados de plaquetas impede contagens confiáveis. Se a amostra contiver aglomerados, uma nova amostra deve ser coletada. O diluente de oxalato de amônio deve ser mantido refrigerado e descartado se houver evidência de contaminação bacteriana. A amostra deve ser contada em até três horas após a coleta.



10.2 Teste de Função Plaquetária

10.3 Retração do Coágulo

10.4 Medição da Agregação Plaquetária

Figura 21. Câmara de contagem do hemocitômetro (a) Neubauer e (b) Neubauer aprimorada

Teste de Função Plaquetária: a principal função das plaquetas é auxiliar a hemostasia por meio da formação de um tampão plaquetário nos locais de lesão vascular. Quando o vaso sanguíneo é lesionado e as microfibrilas subendoteliais e as fibras de colágeno são expostas, as plaquetas se ligam à parede do vaso, um processo denominado adesão plaquetária. Em locais de alto cisalhamento, as plaquetas se ligam aos vasos indiretamente com a ajuda de multímeros de FWW de alto peso molecular. O FWW se liga ao colágeno exposto por meio de seu domínio A3, e as plaquetas se ligam ao FWW ligado ao colágeno por meio de seu receptor GPIIb α . As plaquetas também podem aderir diretamente ao colágeno no subendotélio com os receptores de glicoproteína VI (GPVI) e integrina $\alpha 2\beta 1$. Depois de aderirem à parede do vaso, as plaquetas sofrem uma série de alterações: por meio da reorganização do citoesqueleto plaquetário, elas passam de pequenas estruturas em forma de disco para esferas espiculadas com o desenvolvimento de filopódios. A inversão da membrana transloca fosfolípidios aniônicos pró-coagulantes, principalmente fosfatidilserina, para a superfície externa das plaquetas, formando uma boa plataforma para a geração de trombina. As plaquetas liberam o conteúdo de grânulos alfa (por exemplo, fibrinogênio, FV, FWW e fatores de crescimento) e densos (por exemplo, ADP, ATP, cálcio e serotonina). Isso causa mais ativação plaquetária. A formação de tromboxano A2 (TxA₂) ocorre a partir do ácido araquidônico via fosfolipase A2, ciclooxigenase-1 (COX-1) e TxA₂ sintase. Agonistas plaquetários (ADP, TxA₂ e trombina) ligam-se a receptores de membrana específicos e iniciam a agregação plaquetária pela ativação do receptor de integrina $\alpha 2\beta 3$ (GPIIb-IIIa), que se liga ao fibrinogênio e/ou ao FWW para formar o tampão plaquetário. Anormalidades em qualquer uma dessas vias, que causam adesão, ativação, degranulação e agregação plaquetária, podem ocasionar disfunção plaquetária. Os

distúrbios plaquetários incluem defeitos quantitativos (trombocitopenia) ou qualitativos e podem ser hereditários ou adquiridos. Os sintomas de sangramento são principalmente mucocutâneos, como equimoses, sangramento gengival, hematomas frequentes, menorragia, hemorragia pós-parto e sangramento gastrointestinal (melena, hematêmese ou hematoquezia). Os sintomas podem ser leves ou graves, dependendo da anormalidade. Uma lista de distúrbios hereditários da função plaquetária (IPFDs) com características clínicas e laboratoriais relevantes associadas é apresentada na Tabela 33. A prevalência real de distúrbios plaquetários é desconhecida. Acredita-se que os distúrbios da função plaquetária sejam mais comuns do que se imaginava anteriormente devido ao subdiagnóstico. Em áreas do mundo onde a consanguinidade é comum, doenças autossômicas recessivas como trombastenia de Glanzmann e síndrome de Bernard Soulier têm maior prevalência. Embora o diagnóstico de trombastenia de Glanzmann e síndrome de Bernard Soulier seja relativamente fácil devido ao padrão de agregometria típico, o diagnóstico da maioria dos outros IPFDs é complicado e requer exames complexos. Na investigação de pacientes com suspeita de IPFD, é importante coletar histórico clínico detalhado, incluindo histórico pessoal e familiar. O uso de uma BAT validada, como a BAT da ISTH, é fortemente incentivado. O histórico também deve incluir histórico de medicamentos, ingestão alimentar recente que possa interferir na função plaquetária, presença de outras características (por exemplo, eczema, infecções recorrentes, casos familiares de mielodisplasia, LMA) e possíveis características sindrômicas (por exemplo, perda auditiva, defeitos cardíacos, dismorfismo facial ou ósseo, albinismo) que podem auxiliar no diagnóstico. Investigações laboratoriais preliminares devem incluir hemograma completo, incluindo contagem de plaquetas, exame de esfregaço sanguíneo para verificar a morfologia plaquetária e outras características das células sanguíneas (veja abaixo), determinação do tempo de sangramento cutâneo (descrito na Seção 11), testes de triagem para testes hemostáticos secundários (TP e TTPA) e ensaio de fibrinogênio para excluir outros distúrbios de coagulação. Recomenda-se a realização de testes de triagem para DVW (ou seja, atividade do FVW, antígeno do FVW) concomitantemente ou antes de uma investigação mais aprofundada de distúrbios da função plaquetária. DVW, DVW tipo 2B e DVW tipo plaquetária também podem apresentar macrotrombocitopenia e devem ser considerados em pacientes com baixa contagem de plaquetas. Outro teste simples que pode indicar a presença de um defeito na função plaquetária é o método de retração do coágulo, descrito a seguir.

Retração do coágulo: a retração do coágulo no sangue total coagulado pode indicar o número e a função das plaquetas. Quando o coágulo se retrai, o soro é expresso e o grau de retração do coágulo pode ser medido.

Método: colete 1 mL de sangue em um tubo de ensaio de vidro (75 mm x 10 mm) e mantenha a 37°C. Examine o tubo visualmente até a formação de um coágulo firme. Deixe em repouso a 37°C por mais uma hora. Meça a distância da base do tubo ao menisco. Remova cuidadosamente o coágulo com um palito de madeira fino (por exemplo, um palito de coquetel), deixando o soro que foi expresso pelo coágulo no tubo. Meça a distância da base do tubo ao menisco do soro. Divida a distância do soro pela distância total e multiplique por 100 para obter uma porcentagem.

Interpretação: normalmente, mais de 40% do soro é expresso. Expressão reduzida está presente em alguns defeitos plaquetários, notadamente na trombastenia de Glanzmann. Também pode ser anormal em casos de trombocitopenia grave, síndrome de Wiskott Aldrich e síndrome de Stormorken.

Observações: os tubos e o palito de madeira devem estar absolutamente limpos para evitar que o coágulo grude no tubo. O coágulo deve ser removido com cuidado e delicadeza para evitar que seja espremido e, portanto, que mais soro seja expresso.

Contagem de plaquetas, morfologia e exame de esfregaço de sangue periférico: os testes iniciais em caso de suspeita de distúrbio da função plaquetária devem incluir hemograma completo, juntamente com avaliação de esfregaço de sangue periférico. Isso ajuda a detectar anormalidades no número, tamanho e morfologia das plaquetas, o que pode fornecer pistas importantes para exames laboratoriais adicionais. A contagem de plaquetas pode ser medida por método microscópico manual, contagem automatizada em analisadores hematológicos e marcação imunológica por citometria de fluxo. A estimativa da contagem de plaquetas no esfregaço periférico deve ser realizada para confirmar a contagem de plaquetas, especialmente em casos de macrotrombocitopenia ou anisocitose plaquetária. Em um esfregaço bem preparado e corado, o número médio de plaquetas é contado em 10 campos de imersão em óleo (100x). Este valor deve ser multiplicado por 15.000 para determinar a contagem de plaquetas/ μ L. É importante verificar o esfregaço

para avaliar aglomerados plaquetários, tamanho, morfologia e granularidade das plaquetas. Pseudotrombocitopenia causada por aglutinação plaquetária dependente de EDTA e satelitismo (rosetas de plaquetas ao redor de neutrófilos) deve ser descartada. É importante lembrar que aglomerados plaquetários também podem ser observados na DVW tipo plaquetária ou tipo 2B e não devem ser confundidos com aglutinação induzida por EDTA. A DVW tipo plaquetária também pode apresentar plaquetas grandes no esfregaço. Tamanho anormal das plaquetas é frequentemente uma característica de distúrbios plaquetários hereditários (com ou sem disfunção plaquetária), como mostrado abaixo:

- Plaquetas pequenas: síndrome de Wiskott-Aldrich, trombocitopenia ligada ao X, deficiência de ADAP
- Plaquetas grandes/gigantes: síndrome de Bernard Soulier (gigantes), distúrbios relacionados a MYH9 (gigantes), síndrome das plaquetas cinzentas e síndromes de deficiência de grânulos α , DVW tipo plaquetária, trombocitopenia relacionada a ITGA2B/ITGB3 (variante GT), filaminopatia, trombocitopenia relacionada a SLFN14, defeitos de GATA1, síndrome velocardiofacial
- Plaquetas normais: Todos os demais distúrbios

O volume plaquetário médio (VPM) é um parâmetro prontamente disponível em analisadores hematológicos de contagem de plaquetas por impedância e fornece uma estimativa do tamanho das plaquetas. Os laboratórios devem estabelecer suas próprias faixas de referência, pois o VPM pode variar entre os instrumentos. Plaquetas pequenas podem facilmente passar despercebidas na microscopia óptica e VPM reduzido pode ser o primeiro indício de possível síndrome de Wiskott-Aldrich. Vários fatores podem afetar a medição do VPM e interferir na contagem de plaquetas por impedância, como anormalidades em hemácias e plaquetas. A presença de hemácias microcíticas e fragmentadas pode superestimar a contagem de plaquetas, enquanto a presença de plaquetas grandes e/ou gigantes pode não ser detectada, causando subestimação da contagem de plaquetas. Nesses cenários, a contagem de plaquetas e o VPM não serão confiáveis. É muito útil observar concomitantemente o histograma plaquetário que consegue identificar anormalidades no tamanho das plaquetas e possíveis interferências/contaminação. Na macrotrombocitopenia, contagens ópticas ou fluorescentes de plaquetas fornecem contagens plaquetárias mais precisas. Plaquetas grandes e pálidas com citoplasma cinza-azulado e grânulos azurófilos ausentes ou acentuadamente reduzidos podem ser observadas na síndrome das plaquetas cinzentas devido a deficiência de grânulos α . A síndrome de Paris-Trousseau apresenta plaquetas grandes a gigantes, algumas delas com grânulos α aglomerados/fundidos, formando um único grânulo grande e aglomerado. Anisocitose plaquetária (ou seja, variação no tamanho das plaquetas) e "anisogranularity" (ou seja, variação na granularidade das plaquetas), com presença de plaquetas pálidas e com aspecto vazio, são características clássicas da disfunção plaquetária adquirida com eosinofilia (APDE). APDE é uma diátese hemorrágica transitória associada à eosinofilia, comumente presente em crianças do Sudeste Asiático e revertida com o tratamento da eosinofilia. Anormalidades morfológicas também podem ser observadas em outras células sanguíneas. Presença de corpos de inclusão semelhantes aos de Dohle nos neutrófilos em distúrbios relacionados a MYH9, grânulos citoplasmáticos gigantes peroxidase-positivos em neutrófilos e/ou outros leucócitos na síndrome de Chediak Higashi, corpos de Howell Jolly na síndrome de Stormoken e diseritropoiese em mutações no gene GATA-1.

Medição da agregação plaquetária por agregometria de transmissão de luz: agregometria de transmissão de luz (LTA) é o padrão ouro para testes de função plaquetária. Foi descrita pela primeira vez de forma independente por O'Brien e Born na década de 1960. O princípio se baseia nas alterações na densidade óptica do plasma rico em plaquetas (PRP) à medida que as plaquetas são ativadas e formam agregados. O PRP é turvo devido à suspensão de plaquetas em comparação ao PPP. Depois que agonistas são adicionados ao PRP, as plaquetas formam agregados e se depositam, limpando o plasma e permitindo a passagem de mais luz. A alteração na luz transmitida é medida ao longo do tempo por um agregômetro e representada graficamente. Ao comparar o padrão de resposta de agregação a cada agonista, o tipo de distúrbio da função plaquetária pode ser suspeitado e diagnosticado. Várias excelentes revisões e diretrizes para testes de função plaquetária e diagnóstico de IPFDs foram publicadas.

Precauções antes do estudo de agregação plaquetária (variáveis pré-analíticas na agregação plaquetária): amostras de sangue para LTA devem ser coletadas após um curto período de repouso. Os indivíduos não devem fumar pelo menos 30 minutos antes nem ingerir cafeína pelo menos 2 horas antes do teste. Um registro de todos os medicamentos, incluindo medicamentos nativos/fitoterápicos, administrados nos últimos 10 dias deve ser documentado. Para obter uma lista de medicamentos que podem interferir na função plaquetária, consulte as diretrizes da *British Society for Haematology* sobre testes de função plaquetária mencionados abaixo. Medicamentos que sabidamente inibem de maneira reversível a função plaquetária (por exemplo, AINEs) devem ser interrompidos pelo menos 3 dias antes da coleta. Medicamentos

que sabidamente inibem de maneira irreversível a função plaquetária (por exemplo, aspirina, tienopiridinas) devem ser interrompidos pelo menos 10 dias antes da coleta, a menos que seu efeito esteja sendo especificamente investigado. O ideal é que os pacientes estejam em jejum, de preferência após o período noturno. Caso contrário, evite coletar amostras após refeições gordurosas. Muitos outros ingredientes "normais" da dieta, incluindo álcool, cebola, alho, pimenta e gengibre, também podem inibir a agregação plaquetária. Isso deve ser levado em consideração ao avaliar os resultados. O sangue deve ser coletado com venostase mínima ou inexistente, utilizando uma agulha de calibre 21, no mínimo, em anticoagulante tamponado com citrato de sódio 109 mM ou 129 mM. Os primeiros 3-4 mL de sangue coletados devem ser descartados ou utilizados para outros testes que não a LTA (por exemplo, TP/TTPA). Quando a coleta da amostra for difícil, tubos subpreenchidos podem ser utilizados apenas para descartar defeitos graves da função plaquetária, como trombostenia de Glanzmann ou síndrome de Bernard-Soulier.

Preparação de plasma rico em plaquetas e pobre em plaquetas: as amostras de sangue devem ser deixadas em repouso em temperatura ambiente por pelo menos 15 minutos antes da centrifugação. A refrigeração das plaquetas pode causar ativação e, portanto, as amostras devem ser sempre mantidas em temperatura ambiente. O PRP deve ser preparado centrifugando as amostras de sangue a 200 g por 10 minutos em temperatura ambiente (~21 °C) sem o uso de freio. Para amostras com plaquetas muito grandes, como na síndrome de Bernard-Soulier, o PRP deve ser preparado por sedimentação sanguínea por 30 minutos. O PRP é cuidadosamente removido, evitando contaminação com hemácias ou com a camada leucocitária (a agregação será diminuída se qualquer uma delas estiver presente), em um tubo de polipropileno tampado, mantido na vertical a 20–25°C. O PPP deve ser preparado centrifugando o sangue total, ou os tubos de sangue dos quais o PRP foi removido, em temperatura ambiente a 1500 g por 15 minutos. Amostras muito hemolisadas devem ser rejeitadas. Se a amostra for lipêmica, indique isso no relatório final. É necessário verificar a contagem de plaquetas do PRP. Os resultados dos estudos de LTA podem ser inexatos quando a contagem de plaquetas na amostra de PRP for menor que $150 \times 10^9/L$. Amostras com baixa contagem de plaquetas devem ser interpretadas com cautela, mas podem ser testadas para excluir distúrbios graves da função plaquetária, como trombostenia de Glanzmann, síndrome de Bernard Soulier, DVW tipo 2B e DVW plaquetária. A contagem de plaquetas das amostras de PRP NÃO deve ser ajustada para um valor padronizado com PPP autólogo. A contagem de plaquetas no PRP em amostras de indivíduos com contagem plaquetária normal ($200\text{--}600 \times 10^9/L$) não afeta os resultados dos estudos de LTA. Ajustar a contagem de plaquetas no PRP usando PPP autólogo dentro dessa faixa pode inibir a responsividade plaquetária. Isso provavelmente ocorre porque o PPP pode conter substâncias liberadas das plaquetas durante o trauma adicional da centrifugação em alta velocidade usada na preparação do PPP. Permanece a incerteza sobre qual é a melhor prática a ser seguida quando a contagem de plaquetas no PRP excede $600 \times 10^9/L$. No caso de contagens extremamente altas no PRP ($>1000 \times 10^9/L$), pode ser vantajoso ajustar a contagem plaquetária para um nível mais adequado ao PPP do paciente.

Agentes agregantes ou agonistas: existem dois tipos de agonistas: agonistas fracos e potentes. Agonistas fracos (por exemplo, ADP e epinefrina) em concentrações críticas exibem uma onda primária inicial de agregação devido ao efeito direto induzido pelo agonista, seguida por uma onda secundária de agregação causada pela liberação de grânulos plaquetários e síntese de TXA_2 . Agonistas potentes (por exemplo, trombina, colágeno, TXA_2), por outro lado, exibem apenas uma única curva, sem distinção entre agregação primária e secundária, visto que esses agonistas induzem diretamente a agregação plaquetária, a síntese de TXA_2 e a liberação de grânulos. As diferentes fases da agregação plaquetária são mostradas na Figura 22, que é evidente apenas com agonistas fracos.

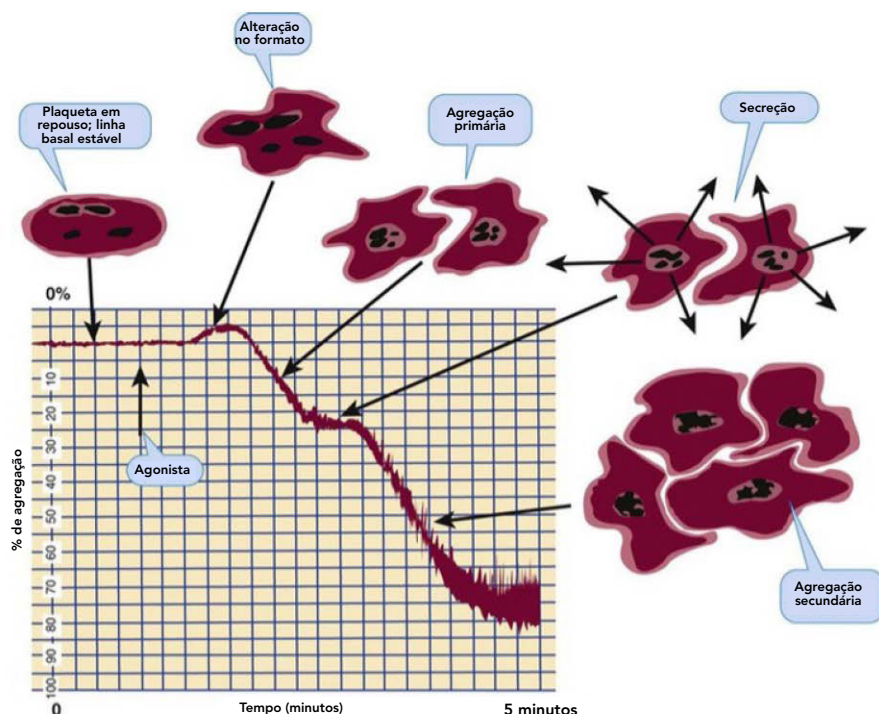


Figura 22. Imagem de Rodak's Hematology: Clinical principles and applications, 5th edition

Tabela 33. Resumo dos agonistas recomendados juntamente com as concentrações que podem ser usadas como painel inicial e painel estendido (concentrações segundo as diretrizes da ISTH)

Agonista	Painel inicial e concentração	Painel estendido e concentração
ADP*	2 μ M	5 μ M, 10 μ M
Epinefrina*	5 μ M	10 μ M
Colágeno (Horm ou tipo 1 fibrilar)	2 μ g/mL	
Ácido araquidônico	1 mM	
Ristocetina (dose baixa)	0,5-0,7 mg/mL	
Ristocetina (dose alta)	1,2-1,5 mg/mL	
Peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP)*, PAR1	-	10 μ M
U46619 mimético do tromboxano A2	-	1 μ M

*Concentrações mais altas devem ser usadas se resultados anormais forem observados com a concentração inicial.

Adenosina-5-difosfato (ADP): uma solução estoque de 1 mM/L do sal dissódico é preparada em OBS e armazenada em pequenas quantidades a -40°C . Essa solução permanece estável por pelo menos três meses. Depois de descongelada, a solução deve ser usada em até três horas ou descartada. Para uso, diluições adicionais são preparadas em OBS. O padrão de resposta ao ADP depende de sua concentração final. A 2 μ mol/L, ondas primárias e secundárias claramente definidas podem ser observadas: a primeira representa o efeito direto induzido pelo agonista e a segunda é causada pela liberação de ADP endógeno e geração de TXA_2 , que por sua vez agrega plaquetas. Abaixo de 2 μ mol/L, cada vez menos indivíduos normais apresentam uma resposta secundária, e a onda primária geralmente é revertida à medida que o ADP é degradado enzimaticamente. Acima de 3 μ mol/L, a fase primária costuma ser tão intensa que a distinção entre ela e a fase secundária é mascarada. O ADP induz uma alteração no formato das plaquetas, de disco para esfera pontiaguda. Isso causa inicialmente discreto aumento na densidade óptica da suspensão plaquetária, que só pode ser observado se a agregação primária estiver prejudicada.

Adrenalina (epinefrina): uma solução estoque de 1 mM/L do sal de bitartarato é preparada em OBS. Deve ser armazenada e usada da mesma forma que a de ADP. Com a adrenalina, as concentrações utilizadas e os padrões de resposta são semelhantes aos do ADP. Porém, na ausência de uma onda secundária, a onda primária não é revertida, nem é tão intensa a ponto de mascarar a onda secundária.

Colágeno: uma suspensão muito estável de fibrilas de colágeno de tendão equino (1 mg/mL), disponível na Hormon-Chemie, Munique, Alemanha, é amplamente utilizada. Diversos outros materiais são igualmente adequados. É armazenada a 4°C e deve ser bem misturada imediatamente antes da diluição no tampão que a acompanha. Deve ser usada na concentração final de 0,5–2,0 µg/mL em PRP, e as suspensões diluídas permanecem estáveis por uma semana a 4°C. Com o colágeno, não ocorre onda primária. A resposta é geralmente definida pela duração da fase de latência anterior ao início da agregação e pela intensidade desta última. Discreto aumento na densidade óptica causado pela alteração no formato precede a agregação. Colágeno de diversas fontes é utilizado. O tipo de colágeno e a espécie a partir da qual a preparação é feita (por exemplo, equino ou bovino) podem ter um efeito importante nos resultados obtidos. De fato, são necessárias concentrações mais de cem vezes maiores, dependendo do material de origem. Portanto, é importante selecionar uma fonte adequada e estabelecer uma faixa de referência local para esse material, que deve ser reavaliada caso a fonte seja alterada. Para uma revisão, consulte Jennings et al. (2008).

Ristocetina: em uma concentração final de ristocetina de 1 mg/mL em PRP, ondas primárias e secundárias distintas são geralmente discerníveis, mas acima disso o efeito direto é tão intenso que as duas fases se fundem. A onda primária é uma medida da quantidade de FVW presente no plasma, enquanto a segunda onda é causada pela liberação de substâncias endógenas.

Ácido araquidônico: araquidonato de sódio (99% de pureza) é dissolvido em OBS a uma concentração de 10 mM/L. Pequenas alíquotas são colocadas em frascos de vidro escuro, que são lavados com nitrogênio para evitar oxidação, hermeticamente fechados e armazenados congelados abaixo de -20°C. A agregação é geralmente monofásica e precedida por uma curta fase de latência.

Reagentes: alguns exemplos de concentrações e diluições de reagentes são mostrados abaixo.

Observação: essas concentrações são apropriadas se uma parte for adicionada a nove partes de PRP. As diluições podem ser feitas em água destilada ou solução salina, ou conforme as instruções do fabricante.

- ✓ ADP (Solução estoque 1000 µM)

Faça uma diluição de 1:10 = 100 µM (ou seja, 0,1 mL de solução de 10.000 µM + 0,9 mL de OBS). A partir disso, faça as concentrações de trabalho apropriadas: 20 µM (ou seja, 0,2 mL de 100 µM + 0,8 mL de OBS), concentração final de PRP de 2-50 µM (ou seja, 0,5 mL de 100 µM + 0,5 mL de OBS), concentração final de PRP de 5 µM. Nos casos em que a hiperagregabilidade estiver sendo testada, concentrações de trabalho mais baixas podem ser necessárias (por exemplo, 10 µM, 5 µM).

- ✓ **Adrenalina (epinefrina):** dilua igual ao ADP para fazer uma concentração de trabalho de 50 µM. Isso resultará em uma concentração final de PRP de 5 µM.
- ✓ **Colágeno:** misture bem e dilua em OBS/outros diluentes: 1:500 (ou seja, 0,1 mL de estoque + 4,9 mL de OBS) = 20 µg/mL, concentração final de PRP de 2 µg/mL.
- ✓ **Ristocetina:** é usada em até duas concentrações diferentes, dependendo dos resultados obtidos. Dose normal de ristocetina de 15 mg/mL ou 12,5 mg/mL, e dose baixa de ristocetina de 7,5 mg/mL ou 5 mg/mL. Isso resultará em uma concentração final de PRP de 1,5 mg/mL ou 1,25 mg/mL e dose baixa de ristocetina de 0,75 mg/mL ou 0,5 mg/mL, respectivamente, dependendo da concentração utilizada.

Método/procedimento: os estudos de LTA devem ser concluídos em no máximo 4 horas após a coleta de sangue. Em razão da refratariedade das plaquetas à agregação após a centrifugação, as amostras de PRP devem ser deixadas em temperatura ambiente por pelo menos 15 minutos antes do teste. O PRP deve ser armazenado em tubos cheios e hermeticamente fechados até o momento do teste. Antes de iniciar, deixe os reagentes/agonistas atingirem a temperatura ambiente. Prepare novas diluições dos reagentes, se necessário. Ligue o agregômetro e o computador/

gravador e aguarde até que a temperatura do agregômetro atinja 37°C. Ajuste a velocidade de agitação para 1000 rpm, a menos que especificado de outra forma pelo fabricante do agregômetro. Pipete 450 µL de PRP em uma cubeta de vidro com barra de agitação magnética. O número de cubetas usadas depende do número de agonistas a serem testados. Pré-aqueça as cubetas de PRP nos poços de incubação ao redor do bloco aquecedor por 2-5 minutos. Pipete 500 µL de PPP em outra cubeta de vidro sem barra de agitação e coloque no poço de referência do branco correspondente. PRP e PPP autólogo devem ser usados para definir 0% e 100% de transmissão de luz no agregômetro. Deixe funcionar por 1 minuto antes de adicionar o agonista. Pipete 50 µL de agonista no fundo da cubeta de PRP sem produzir bolhas. O volume de agonista adicionado para LTA deve ser consistente e nunca acima de 10% do volume total da amostra. Uma amostra de controle conhecida deve ser analisada paralelamente à do paciente. A agregação plaquetária deve ser monitorada por no mínimo 3 minutos após a adição de um agonista e por até 10 minutos para agonistas que não atingirem a agregação máxima em 3-5 minutos. Repita o procedimento para cada agonista.

Observações: se uma resposta anormal for observada com o painel inicial de agonistas, um painel estendido adicional (Tabela 35) pode ser adicionado juntamente com liberação de ATP por lumiagregometria (veja abaixo). Concentrações mais altas de agonistas (por exemplo, ADP, epinefrina) devem ser usadas se uma resposta anormal for observada na concentração inicial. Se nenhuma resposta de agregação for observada com o ácido araquidônico, adicione o agonista, análogo do receptor de TXA₂ (TRA), U46619. Em defeitos na síntese de TXA₂ (deficiência da COX/TXA₂ sintase) ou efeito da aspirina, resposta normal é observada com TRA. Em casos de defeito do receptor de TXA₂, respostas anormais são observadas tanto com ácido araquidônico quanto com TRA. Resposta anormal isolada com epinefrina pode ser observada em uma proporção de indivíduos saudáveis. No entanto, essa pode ser a única característica de distúrbio plaquetário de Quebec na LTA. Ao estudar a agregação plaquetária como parte de uma avaliação de hiperagregabilidade, ADP e adrenalina são usados em concentrações mais baixas para obter uma curva de dose-resposta. As concentrações usadas são: 2 µM, 1 µM, 0,5 µM e 0,1 µM de concentração final em PRP. Agregação espontânea também é realizada antes que o restante dos agonistas sejam testados. Se as plaquetas se hiperagregarem com 0,5 mg/mL de ristocetina, isso indica possível DVW tipo 2B ou DVW tipo plaquetária. Verifique se há agregação espontânea monitorando o PRP nas mesmas condições de agitação do agregômetro, sem adicionar nenhum agonista para estimular a agregação. Realize estudos de mistura para diferenciar os dois subtipos. Isso pode ser feito por dois métodos. Procedimento básico: misture volumes iguais de plasma de paciente com plaquetas normais (ou seja, 225 µL de PPP de paciente + 225 µL de PRP de controle). Essa mistura é então testada com ristocetina a 0,5 mg/mL. A presença de aglutinação sugere DVW tipo 2B. A ausência de aglutinação pode ser causada por DVW tipo plaquetária. É importante observar que a ausência de resposta também pode ser devido a diluição adicional de PRP.

Procedimento alternativo: lave as plaquetas de paciente e controle três vezes com PBS-EDTA em tubos de centrífuga de 15 mL (baixa velocidade de centrifugação para peletizar as plaquetas). Ressuspenda cuidadosamente as plaquetas de paciente no plasma normal e as plaquetas normais no plasma de paciente. Ajuste a contagem de plaquetas para 400 x 10⁶ plaquetas peletizadas (observe que PBS-EDTA é preparado adicionando EDTA dissódico 9 mM à PBS e ajustando o pH para 7,0. A PBS utilizada contém NaCl 135 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 8 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM, com pH de 7,4.) Reteste com ristocetina a 0,5 mg/mL. As reações devem se encaixar em um dos padrões abaixo.

Tabela 34. Interpretação de DVW tipo 2B e DVW tipo plaquetária

Tubo 1	Plaquetas de paciente lavadas + PPP de controle	Sem aglutinação	Aglutinação
Tubo 2	Plaquetas de controle lavadas + PPP de paciente	Aglutinação	Sem aglutinação
	INTERPRETAÇÃO	DVW tipo 2B	DVW tipo plaquetária

As diretrizes para DVW de 2021 favorecem o uso de testes genéticos direcionados no diagnóstico de DVW tipo 2B e tipo plaquetária. Contudo, isso pode não ser viável para muitos laboratórios devido a restrições de custo. O estudo de mistura com RIPA ainda é mantido como um dos testes no algoritmo diagnóstico, de acordo com a ISTH.

Interpretação e relato dos resultados: o traçado da agregação plaquetária deve ser avaliado com base na presença de alteração no formato, duração da fase de latência (alguns agonistas, como o colágeno, podem ter uma fase de latência mais longa), agregação máxima (método mais conveniente e comumente utilizado para relato dos resultados), inclinação da agregação (indica a taxa de agregação), exame visual dos traçados de agregação (ou seja, desagregação,

presença de onda secundária — particularmente distinta para epinefrina e baixas doses de ADP). A desagregação com ADP é particularmente marcante em defeitos hereditários do P2Y₁₂. O PRP preparado da mesma forma a partir de um doador normal sadio deve ser processado e analisado simultaneamente com o de paciente como verificação dos reagentes. Isso é especialmente importante se forem obtidos resultados anormais do paciente, pois alguns agonistas são lábeis, particularmente depois de diluídos até concentrações de trabalho. Os laboratórios clínicos devem estabelecer intervalos de referência apropriados para a concentração de cada agonista. Resultados de indivíduos normais sadios testados juntamente com o paciente podem ser usados para obter as faixas de referência. É necessária muita cautela ao interpretar os padrões de agregação plaquetária. Vários fatores técnicos podem influenciar os resultados. Tenha em mente que há uma série de diferenças importantes entre a agregação determinada por nefelometria e aquela que ocorre no corpo. No entanto, informações úteis para o diagnóstico podem ser obtidas, e alguns exemplos de padrões de agregação são mostrados na Tabela 35.

Tabela 35. Resultados de agregação plaquetária em vários distúrbios

Distúrbio	ADP	Colágeno	Ristocetina 1,25 mg/mL	Ristocetina 0,5 mg/mL	Ácido araquidônico	Adrenalina
DVW tipo 1 e 2A	N	N	A/R**	A	N	N
DVW tipo 2B	N	N	N	H	N	N
Síndrome de Bernard-Soulier	N	N	A	A	N	N
Trombastenia de Glanzmann	A	A	N	A	A	A
Doença do pool de armazenamento	P/N	R/N	N	A	R/N	P/N
Defeito da ciclooxygenase*	R/N	R	N	A	R/A	R/N

N = Normal; A = Ausente; R = Reduzida; H = Resposta elevada; P = Apenas onda primária

*Ou efeito da aspirina

**Pode ser normal na DVW tipo 1 leve

Investigação adicional da função plaquetária: se um padrão de agregação anormal for observado em um indivíduo, é aconselhável repetir a avaliação em pelo menos mais uma ocasião para verificar a consistência da anormalidade. Na presença de agregação anormal, investigações adicionais podem ser úteis. Estas incluem a medição do conteúdo dos nucleotídeos plaquetários e sua liberação durante a agregação plaquetária. A quantificação de glicoproteínas de membrana pode ser realizada para o diagnóstico inequívoco de síndrome de Bernard-Soulier e trombastenia de Glanzmann (veja abaixo).

Liberação de ATP por lumiagregometria: lumiagregometria é o método mais amplamente utilizado para avaliar a função de liberação dos grânulos densos das plaquetas. Tem a vantagem de que LTA e liberação de ATP dos grânulos densos podem ser medidas simultaneamente. Baseia-se no princípio da reação luciferina-luciferase. Quando as plaquetas são ativadas, os grânulos densos liberam o ATP e o ADP armazenados. O ATP liberado reage com a luciferina na presença de luciferase, produzindo luminescência que pode ser quantificada em relação a um padrão de ATP. Secreção defeituosa de ATP pode ser observada tanto na deficiência de grânulos densos quanto em defeitos de secreção primária. A distinção entre as duas entidades requer testes adicionais, como medição do teor total de ATP-ADP nas plaquetas por ensaios bioluminescentes, ensaios de liberação de serotonina com ¹⁴C-5-HT radiomarcado, ensaio de mepacrina por citometria de fluxo (veja abaixo) ou avaliação de grânulos densos por microscopia eletrônica de transmissão de montagem completa.

Tabela 36. Fatores técnicos que influenciam a função plaquetária

Anticoagulante	1/10 do volume de citrato trissódico.
Tempo	Iniciar os testes 30 minutos após a preparação do PRP. Concluir os estudos em até quatro horas após a coleta de sangue.
Centrifugação	Deve ser suficiente para remover hemácias e leucócitos, mas não plaquetas grandes. Deve ser realizada em temperatura ambiente, não a 4°C. Plaquetas grandes podem ser separadas por sedimentação.
Contagem de plaquetas	Contagens baixas $<100 \times 10^9/L$ causam respostas lentas e fracas. Contagens altas $>1000 \times 10^9/L$ podem apresentar resposta reduzida.
pH	$<pH\ 7,7$ inibe a agregação. $>pH\ 8,0$ aumenta a agregação.
Velocidade de mistura	$<800\ rpm$ mostra agregação reduzida. $>1200\ rpm$ desfaz aglomerados de plaquetas.
Hematócrito	$>55\%$ mostra progressivamente menos agregação, especialmente inibição da segunda fase devido ao aumento da concentração de citrato.
Temperatura	$<35^\circ C$ mostra diminuição da agregação com doses regulares de todos os agonistas, mas aumento da resposta a baixas doses de ADP.
Lipemia	O aumento de quilomícrons causa agregação reduzida.
Cubeta suja	Pode causar agregação espontânea aparente
Sem barra de agitação	Nenhuma resposta na adição de agente agregante.
Bolhas de ar	Oscilações rápidas e amplas da caneta antes da agregação. Também causadas por baixa contagem de plaquetas.

Diferenças entre condições de agregação plaquetária in vivo e in vitro: nos exames de sangue *in vitro*, o sangue é anticoagulado, os glóbulos vermelhos e brancos são removidos, os componentes vasculares não estão envolvidos, a coagulação não está envolvida, a população de plaquetas é selecionada, os produtos de ativação e liberação plaquetária são mantidos, os reagentes usados são não fisiológicos na composição e dosagem, as plaquetas são instáveis fora do corpo e os medicamentos podem apresentar efeitos mais ou menos acentuados do que in vivo.

Teste de Função Plaquetária por Citometria de Fluxo: a citometria de fluxo pode fornecer informações úteis para o diagnóstico e a classificação de distúrbios da função plaquetária. Pode ser utilizada para análise de receptores de glicoproteínas, teste de função plaquetária após estimulação com agonista, medição da função pró-coagulante das plaquetas (por exemplo, ligação à anexina V) e avaliação do conteúdo de grânulos alfa e densos. As principais vantagens da citometria de fluxo são a necessidade de pequenos volumes de amostra, ela pode ser realizada em sangue total e não é limitada por trombocitopenia. Isso se torna particularmente útil em pacientes pediátricos e trombocitopênicos.

Análise de glicoproteínas de superfície plaquetária por citometria de fluxo: a trombastenia de Glanzmann, caracterizada por $\alpha IIb\beta 3$ anormal ou ausente, pode ser detectada com anticorpos monoclonais anti-GPIIb (CD41) ou CDIIIa (CD61) marcados com fluorescência, e a síndrome de Bernard Soulier, caracterizada por GPIb/V/IX anormal ou ausente, pode ser diagnosticada com anticorpos direcionados contra GPIb (CD42b) ou GPIX (CD42a). Além disso, outros IPFDs menos comuns que afetam os receptores $\alpha 2\beta 1$ (CD49/CD29), GPIV (CD36) ou GPVI também podem ser diagnosticados com os respectivos anticorpos. A análise de moléculas de superfície pode ser feita até 24 horas após a coleta. Teste de ativação plaquetária (PACT) por citometria de fluxo. O PACT permite a medição simultânea de uma ampla gama de diferentes marcadores de ativação da função plaquetária, permitindo assim uma análise mais abrangente de várias vias envolvidas na função plaquetária. As plaquetas podem ser identificadas por meio de suas propriedades características de dispersão frontal (FSC) e dispersão lateral (SSC) e, preferivelmente, pela adição de um receptor de glicoproteína específico (por exemplo, CD41). Alguns dos marcadores de ativação comumente usados são: PAC-1 (anticorpo monoclonal que se liga especificamente à forma conformacional ativada de $\alpha IIb\beta 3$), CD62P ou P-selectina (um dos conteúdos dos grânulos α , pode ser usado como marcador de liberação

de grânulos α) e CD63 (pode ser usado como marcador de liberação de grânulos δ). O teste pode ser realizado utilizando uma combinação de agonistas que visam diferentes vias, como ADP, peptídeo ativador do receptor de trombina (TRAP) e convulxina. A expressão dos marcadores de ativação nas plaquetas é medida (usando MFI e/ou %) na linha basal (antes da adição do agonista) e após a estimulação com agonista. Expressão reduzida após estimulação com agonista sugere defeito/anormalidade na via específica. É importante analisar uma amostra de controle simultaneamente, da mesma forma que na LTA.

Ligação do FVW induzida por ristocetina por citometria de fluxo: a função do receptor GP1b/V/IX e do FVW também pode ser avaliada por citometria de fluxo, medindo a expressão de FVW nas plaquetas após a adição de doses normais e baixas de ristocetina. Anticorpo monoclonal anti-FVW pode ser utilizado. Estudos de mistura com plasma de paciente e plasma de controle, e vice-versa, com baixas doses de ristocetina, conseguem diferenciar a DVW tipo 2B e a DVW tipo plaquetária.

Ensaio de captação e liberação de mepacrina por citometria de fluxo: o ensaio de captação e liberação de mepacrina também pode ser usado para avaliar defeitos nos grânulos δ . A mepacrina é um derivado fluorescente da acridina que se liga aos nucleotídeos de adenosina plaquetária com alta afinidade. Após incubação das plaquetas com mepacrina a 37°C por 30 minutos, ela é captada seletivamente pelos grânulos densos, o que pode ser medido pelo aumento da fluorescência por citometria de fluxo. A função de liberação também pode ser avaliada medindo a fluorescência da mepacrina após estimulação com agonista (por exemplo, convulxina ou TRAP). A fluorescência é medida na linha basal (apenas plaquetas), após a adição de mepacrina (plaquetas + mepacrina) e após a adição do agonista (plaquetas + mepacrina + agonista). As razões de captação e liberação podem ser calculadas. Captação e liberação diminuídas são observadas na deficiência de grânulos densos, enquanto captação normal com liberação reduzida é observada em defeitos de secreção.

Atividade pró-coagulante das plaquetas: após estimulação simultânea de plaquetas com convulxina e trombina, um subconjunto de plaquetas expressa o fosfolípido aniônico pró-coagulante fosfatidilserina na superfície das plaquetas ativadas. Isso pode ser avaliado usando anexina V ou lactaderina marcada com fluorescência, que se liga à fosfatidilserina. A translocação de fosfolípidios pró-coagulantes facilita a montagem de fatores de coagulação para geração de trombina na superfície das plaquetas. A citometria de fluxo permite a detecção de atividade pró-coagulante comprometida (síndrome de Scott) ou aumentada (síndrome de Stormoken) e suas síndromes associadas.

Tabela 37a. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos dos receptores de glicoproteínas					
Trombastenia de Glanzmann	ITGA2B, ITGB3	Normal	Resposta ausente a todos os agonistas, exceto aglutinação à ristocetina	Citometria de fluxo identifica deficiência de GPIIb/GPIIIa	Autossômico recessivo, sangramento grave
Trombocitopenia relacionada a ITGA2B/ITGB3	ITGA2B, ITGB3	Macrotrombocitopenia com anisocitose	Resposta ausente/comprometida a todos os agonistas, exceto aglutinação à ristocetina	Expressão reduzida de GPIIb/GPIIIa Expressão defeituosa de PAC1	Autossômico dominante, sangramento leve a moderado
Síndrome de Bernard Soulier	GP1BA, GP1BB, GP9	Macrotrombocitopenia	Resposta ausente de aglutinação à ristocetina	Citometria de fluxo identifica deficiência de GP1b-IX-V	Autossômico recessivo, sangramento moderado/ grave
Síndrome de DiGeorge/velocardiofacial/síndrome de deleção 22q11.2	Del22q11.2	Contagens de plaquetas normais/ discretamente reduzidas com plaquetas grandes	Agregação normal/ variável (resposta reduzida à ristocetina em ~30% dos casos)	Expressão reduzida de GP1b/IX/V por citometria de fluxo	Fenda palatina, defeitos cardíacos, fâcies anormal, deficiências de desenvolvimento, imunodeficiência, sangramento leve a significativo
DVW tipo plaquetária	Mutação de ganho de função no GP1BA	Macrotrombocitopenia, aglomerados de plaquetas	Aumento da aglutinação com baixa concentração de ristocetina	Multímeros de FVW de alto peso molecular reduzidos (atividade do FVW reduzida)	Autossômico dominante, sangramento leve a moderado
Defeitos dos receptores de colágeno	GP6 ND	Normal	Resposta isolada de agregação reduzida ao colágeno	Deficiência de GPVI ou $\alpha 2\beta 1$ por citometria de fluxo	Autossômico recessivo, sangramento leve

Tabela 37b. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Anormalidades dos receptores acoplados à proteína G					
Defeito do receptor de TXA ₂ (TP)	TBXA2R	Normal	Agregação anormal com AA e análogo de TXA ₂ (U46619)		Autossômico recessivo, diátese hemorrágica leve
Defeito do receptor de ADP (P2Y12)	P2Y12	Normal	Resposta de agregação acentuadamente prejudicada ao ADP (apenas onda primária); resposta reduzida com outros agonistas também pode ser observada	Diminuição da expressão de marcadores de ativação na estimulação com agonista por ADP	Autossômico recessivo, sangramento leve após trauma/cirurgia
Defeitos dos grânulos plaquetários (isolados/sindrômicos)					
Defeitos dos grânulos alfa					
Síndrome das plaquetas cinzentas	NBEAL2	Macrotrombocitopenia; plaquetas grandes com citoplasma cinza-azulado e grânulos azurófilos ausentes	Variável, anormalidades leves; pode ser normal	Grânulos α ausentes/ reduzidos por ME Expressão de P-selectina reduzida/ ausente por citometria de fluxo/ELISA	Autossômico recessivo; sangramento leve, mielofibrose progressiva com esplenomegalia
Artrogripose renal colestática (ARC)	VPS33B, VIPAS39	Plaquetas cinzentas grandes	Variável, anormalidades leves; pode ser normal	Grânulos α ausentes/ reduzidos por ME P-selectina está reduzida em alguns e normal em outros	Contraturas em flexão, hipotonia, icterícia colestática, acidose tubular renal, déficit de crescimento, ictiose, infecção, diátese hemorrágica leve
Síndrome de Paris-Trousseau/Jacobsen	Del11q23 incluindo FL1	Plaquetas grandes, poucas com grânulos α fundidos	Variável	Grânulos α gigantes fundidos na ME, dismegacariopoiese	Diátese hemorrágica leve, atraso no desenvolvimento, defeitos cardíacos, anomalias craniofaciais

Tabela 37c. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos dos grânulos densos					
Deficiência de grânulos densos isolada/ deficiência de pool de armazenamento δ		Normal	Variável. Pode ser reduzida a vários agonistas: ADP, colágeno e epinefrina, ou normal	Diminuição da liberação de ATP por lumiagre-gometria Redução do ADP plaquetário e aumento da relação ATP/ADP	
Síndrome de Hermansky-Pudlak	HPS1, AP3B1 (HPS2), HPS3, HPS4, HPS5, HPS6, DNTBP1 (HPS7), BLOC1S3 (HPS8) e BLOC1S6 (HPS9)	Normal	Variável	Grânulos densos reduzidos/ ausentes por TEM de montagem completa Redução de CD63 e redução da captação e liberação de mepacrina por citometria de fluxo	Albinismo oculocutâneo, imunodeficiência, diátese hemorrágica leve, fibrose pulmonar, colite granulomatosa e neutropenia.
Trombocitopenia relacionada a SLFN14	SLFN14	Macrotrombocitopenia	Variável		
Síndrome de Chediak-Higashi	LYST	Grânulos citoplasmáticos gigantes peroxidase-positivos em leucócitos; linfocitose	Variável		Albinismo oculocutâneo variável, infecções recorrentes de risco à vida, diátese hemorrágica leve
Distúrbios combinados de grânulos α/ grânulos δ	ND	Plaquetas cinzentas pálidas por microscopia de luz	Variável	Grânulos α e δ ausentes/ reduzidos na TEM e outras características observadas em distúrbios de grânulos alfa e densos	Diátese hemorrágica leve a moderada
Defeito de secreção de grânulos ou defeito de secreção primária	ND	Normal	Variável	Diminuição da liberação de ATP por lumiagre-gometria, captação normal de mepacrina com liberação reduzida de mepacrina por citometria de fluxo Redução da expressão de CD63 por citometria de fluxo; grânulos alfa e densos normais por ME	Diátese hemorrágica leve a moderada

Tabela 37d. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos dos fatores de transcrição					
Distúrbios plaquetários familiares com malignidade mieloide associada (FPD/LMA)	RUNX1	Trombocitopenia	Agregação anormal a múltiplos agonistas	Defeito de secreção de grânulos δ	Predisposição para desenvolver SMD e LMA
Defeito dos grânulos δ relacionado a FLI1	FLI1	Trombocitopenia	Agregação reduzida a colágeno e TRAP	Defeito de secreção de grânulos δ	
Defeito de GATA1	GATA1	Macrotrombocitopenia	Agregação reduzida a colágeno e ristocetina	Conteúdo e liberação reduzidos de grânulos α	
Defeito relacionado a GFI1B	GFI1B	Macrotrombocitopenia, diseritropoiese	Normal	Liberação reduzida de grânulos α	Autossômico dominante
Defeitos das proteínas de transdução de sinal					
Defeito da fosfolipase A2 citosólica/ Deficiência de ciclooxygenase/ Deficiência de TXA ₂ sintase	PLA2G4A/ ND/ TBXAS1	Normal	Resposta ausente com AA e resposta normal com TXA ₂		
Defeito da CalDAG-GEFI	RASGRP2	Normal	Resposta acentuadamente reduzida/ ausente a ADP, epinefrina, resposta reduzida/ normal a colágeno, TRAP e ristocetina	Expressão normal de GPIIb/GPIIIa Expressão defeituosa de PAC1	Autossômico recessivo, sangramento grave
Deficiência de adesão leucocitária tipo III	FERMT3	Leucocitose	Padrão tipo GT	Expressão normal de GPIIb/GPIIIa Expressão defeituosa de PAC1	Autossômico recessivo, infecção bacteriana grave, má cicatrização de feridas, sangramento grave

Tabela 37e. Resumo dos distúrbios hereditários da função plaquetária com características clínicas e laboratoriais

Distúrbio	Defeito genético	Contagem e morfologia de plaquetas/outras características de PBS	LTA	Características laboratoriais adicionais	Características clínicas adicionais (+/-sindrômicas)
Defeitos das proteínas do citoesqueleto					
Síndrome de Wiskott Aldrich (WAS)/ trombocitopenia ligada ao X	WAS	Microtrombocitopenia		Diminuição de subconjuntos de células T, função das células natural killer, diminuição de grânulos α e δ por TEM	WAS: herança ligada ao X; eczema, imunodeficiência, malignidades e autoimunidade
Doença relacionada a MYH9 (anteriormente conhecida como síndromes de Sebastian, May-Hegglin, Fechtner e Epstein)	MYH9	Macrotrombocitopenia, corpos de inclusão semelhantes aos de Dohle nos neutrófilos	Normal		Autossômico dominante; associação variável com perda auditiva neurossensorial, catarata e nefrite
Defeito de ADAP	FYB	Microtrombocitopenia		Expressão aumentada de P-selectina e PAC-1, mas expressão prejudicada após ativação	
Defeitos dos fosfolípidios de membrana					
Síndrome de Scott	TMEM16F	Normal	Normal	Ligação à anexina reduzida por citometria de fluxo	Autossômico recessivo
Síndrome de Stormorken	STIM1, ORAI1	Anemia, corpos de Howell Jolly	Normal	Ligação à anexina V aumentada e expressão defeituosa de PAC-1	Dismorfismo facial, ictiose, miopatia
Atividade fibrinolítica plaquetária aumentada					
Distúrbio plaquetário de Quebec	PLAU (duplicação)	Variável trombocitopenia	Resposta anormal com epinefrina	Excesso de ativador do plasminogênio do tipo uroquinase nas plaquetas causando proteólise de proteínas dos grânulos α e fibrinólise	Autossômico dominante, sangramento de início tardio após cirurgia/trauma, ausência de resposta a antifibrinolíticos, mas responsivo a antifibrinolíticos

Referências

- Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135(5): 603-633.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- The British Society for Haematology Haemostasis and Thrombosis Task Force. Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol* 1988; 41(12): 1322-1330.
- Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, Lecompte T, Latger-Cannard V. Usefulness of flow cytometric mepacrine uptake/release combined with CD63 assay in diagnosis of patients with suspected platelet dense granule disorder. *Semin Thromb Hemost* 2016; 42(3): 282-291.

- Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D et al. Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: A consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* 2013; 11(6): 1183-1189.
- Cattaneo M, Hayward CP, Moffat KA, Pugliano MT, Liu Y, Michelson AD. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: A report from the platelet physiology subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2009; 7(6): 1029.
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F. Platelet aggregation studies: Autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 2007; 92(5): 694-697.
- Chanarin I (ed). *Laboratory Haematology: An Account of Laboratory Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1989.
- Dave RG, Geevar T, Chellaiya GK, Mammen JJ, Vijayan R, Samuel A, Gowri M, Nair SC. Stability and utility of flow cytometric platelet activation tests: A modality to bridge the gap between diagnostic demand and supply. *Platelets* 2022; 33(7): 1043-1051.
- Franchini M, Montagnana M, Lippi G. Clinical, laboratory and therapeutic aspects of platelet-type von Willebrand disease. *Int J Lab Hematol* 2008; 30(2): 91-94.
- Frontroth JP, Favaloro EJ. Ristocetin-induced platelet aggregation (RIPA) and RIPA mixing studies. *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 473-494.
- Gomez K, Anderson J, Baker P, Biss T, Jennings I, Lowe G, Platton S. Clinical and laboratory diagnosis of heritable platelet disorders in adults and children: A British Society for Haematology guideline. *Br J Haematol* 2021; 195(1): 46-72.
- Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13(2): 314-322.
- Gresele P, Bury L, Mezzasoma AM, Falcinelli E. Platelet function assays in diagnosis: An update. *Expert Rev Hematol* 2019; 12(1): 29-46.
- Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hematol* 2018; 40 Suppl 1: 34-45.
- Jennings I, Woods TA, Kitchen S, Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008; 61(8): 950-954.
- Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, Lordkipanidzé M. Advances in platelet function testing-light transmission aggregometry and beyond. *J Clin Med* 2020; 9(8): 2636.
- Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: An adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost* 2008; 6(4): 677-683.
- Rand ML, Reddy EC, Israels SJ. Laboratory diagnosis of inherited platelet function disorders. *Transfus Apher Sci* 2018; 57(4): 485-493.
- van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, Huisman A, Korpelaar SJA, Urbanus RT. Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 689-698.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Classificação e Critérios Diagnósticos de SAF
 - ✓ Anticoagulante Lúpico
 - ✓ Anticorpos Antifosfolípídios
-

Um grupo heterogêneo de anticorpos que podem causar prolongamento do teste de TTPA são os anticorpos antifosfolípídios, que geralmente reagem com epítomos em proteínas que são complexadas com fosfolípídios carregados negativamente. Muitos desses anticorpos requerem beta-2-glicoproteína 1, uma proteína que se liga a fosfolípídios. Outros podem ser direcionados contra a protrombina. A identificação adequada desses anticorpos permitirá a caracterização da síndrome do anticorpo antifosfolípideo (SAF) (Ruiz-Irastorza et al, 2010; Schreiber et al, 2018). É importante notar que esses anticorpos podem interferir nas reações de coagulação no laboratório, prolongando testes dependentes de fosfolípídios, como o TTPA e, ocasionalmente o TP, mas não estão associados a sangramento, exceto em alguns casos raros em que há deficiência de protrombina adquirida significativa. Paradoxalmente, esses anticorpos estão claramente associados a trombose venosa e arterial por mecanismos que não são bem compreendidos. Em centros de diagnóstico de distúrbios hemorrágicos, é necessário detectar esses anticorpos por meio de testes específicos para a investigação de pacientes com TTPA prolongado (Barbosa et al, 2019). Atualmente, existem diretrizes específicas para a realização correta dos testes utilizados no diagnóstico laboratorial de SAF, que podem ser usadas para atualizar as informações laboratoriais (veja abaixo).

- Devreese, K.M.J.; de Groot, P.G.; de Laat, B.; Erkan, D.; Favaloro, E.J.; Mackie, I.; Martinuzzo, M.; Ortel, T.L.; Pengo, V.; Rand, J.H.; et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. J. Thromb. Haemost. 2020; 18, 2828–2839.
- Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL; Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Phospholipid/Dependent Antibodies. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: guidance from the SSC of the ISTH. J Thromb Haemost. 2014; 12(5): 792-795.
- Vandeveld A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti-β2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. J Thromb Haemost. 2024: S1538-7836(24)00236-8.

Classificação e Critérios Diagnósticos de SAF: desde que ficou claro que os anticorpos antifosfolípídios estavam significativamente associados a trombose vascular e morbidade gestacional, a necessidade de critérios de consenso para SAF resultou nos critérios de Sydney, Tabela 38 (Miyakis et al, 2006). Os pacientes são classificados como portadores de SAF quando um evento clínico ocorre junto com pelo menos um critério laboratorial positivo. Os critérios laboratoriais para definição de SAF são a presença de anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM ou a2GPI IgG/IgM, persistentemente presente por no mínimo 12 semanas. Atualmente, uma nova iniciativa internacional está sendo realizada no sentido de desenvolver novos critérios para classificar SAF. Os critérios laboratoriais propostos incluem apenas os anticorpos dos critérios vigentes (anticoagulante lúpico, aCL IgG/IgM e a2GPI IgG/IgM).

Tabela 38. Critérios de Sydney de 2006 para classificação da SAF

Critérios clínicos	Critérios laboratoriais
1. Trombose vascular	1. Anticoagulante lúpico
Venosa, arterial ou microvascular;	≥2 resultados positivos
Confirmada por critérios objetivos validados;	Pelo menos 12 semanas de intervalo
Nenhuma evidência de inflamação na parede do vaso	
E/ou	
2. Morbidade gestacional	2. Anticorpo anticardiolipina IgG e/ou IgM
≥1 morte fetal inexplicada _10ª semana de gestação ou;	Soro e plasma
≥1 parto prematuro <34ª semana de gestação por: eclâmpsia ou pré-eclâmpsia grave, insuficiência placentária;	Título médio ou alto (>40 GPL ou MPL, ou >99º percentil),
≥3 abortos consecutivos inexplicados <10ª semana de gestação.	Medido por ELISA padronizado
	≥2 resultados positivos
	Pelo menos 12 semanas de intervalo
E/ou	
	3. Anticorpo anti-β2 glicoproteína I IgG e/ou IgM
	Soro e plasma
	Título médio ou alto (>40 GPL ou MPL, ou >99º percentil),
	Medido por ELISA padronizado
	≥2 resultados positivos
	Pelo menos 12 semanas de intervalo

Anticoagulante lúpico

Como escolher o teste? O anticoagulante lúpico pode ser detectado por diferentes testes de coagulação dependentes de fosfolipídios. A atualização mais recente das diretrizes da ISTH sobre detecção de anticoagulante lúpico recomenda o uso de dois testes em paralelo: o tempo de veneno de víbora de Russell diluído (dRVVT) e o TTPA (Devreese et al, 2020). O dRVVT é mais específico, enquanto o TTPA é mais sensível para o anticoagulante lúpico (dependendo muito do reagente utilizado). Os dois ensaios são complementares, pois os anticorpos nem sempre reagem em ambos. O ensaio de dRVVT baseia-se na ativação direta do FX por uma enzima presente no veneno das víboras de Russell. O ensaio de TTPA baseia-se na ativação da via de contato (intrínseca) da cascata de coagulação. A seleção de reagentes apropriados para fins de teste de anticoagulante lúpico é importante, visto que existem diversos reagentes disponíveis, especialmente para TTPA (Favaloro et al, 2019). Dois tópicos na seleção do reagente de TTPA precisam ser abordados: a escolha do agente ativador e a composição e concentração dos fosfolipídios. Como alternativa ao TTPA, o teste de tempo de coagulação de sílica (SCT) pode ser usado para teste de anticoagulante lúpico. O desempenho dos ensaios de anticoagulante lúpico deve ser validado ou verificado antes da implementação na prática clínica. Parte do processo de verificação deve incluir o teste de amostras com anticoagulante lúpico conhecido e valores médios bem caracterizados (Gardiner et al, 2021a; Gardiner et al, 2021b).

Como o teste é realizado? A avaliação do anticoagulante lúpico consiste em um procedimento de três etapas: triagem, mistura e confirmação (Devreese et al, 2020). O PPP é necessário para evitar resultados falso-negativos em razão da interação de fosfolipídios e plaquetas. A etapa de triagem inclui testes com reagentes de dRVVT e TTPA em baixas concentrações de fosfolipídios. Deficiência de fator de coagulação ou inibidores diferentes do anticoagulante lúpico podem provocar um teste de triagem positivo, por isso uma etapa de teste de mistura e de confirmação é necessária. O procedimento em etapas pode reduzir custos, pois evita a realização desnecessária da etapa de mistura e confirmação se a etapa de triagem for negativa. Na etapa de confirmação, um excesso de fosfolipídio aniônico é adicionado ao reagente de teste, e o excesso de fosfolipídio pode reduzir ou neutralizar os anticorpos.

Nos testes de dRVVT, os ensaios de triagem e confirmação são realizados em paralelo, e o resultado da etapa de confirmação é expresso como razão normalizada de acordo com o cálculo: $[(\text{resultado do paciente na triagem})/(\text{resultado do pool na triagem})]/[(\text{resultado do paciente na confirmação})/(\text{resultado do pool na confirmação})]$. Na etapa de mistura, o teste de triagem é realizado em uma mistura de plasma de paciente e pool de plasma normal na proporção 1:1. O teste de mistura é expresso como a razão normalizada $[(\text{mistura na triagem})/(\text{pool de plasma normal na triagem})]$. Quando o tempo de coagulação no ensaio de confirmação é prolongado, uma etapa de mistura adicional com os reagentes confirmatórios (mistura de confirmação) pode ser realizada, e a razão é mais robusta e menos afetada pela interferência de deficiências congênitas ou adquiridas de fatores. Existem ensaios integrados que realizam todas as três etapas em um único procedimento. Nesses ensaios, os testes de triagem e confirmatórios são realizados paralelamente no plasma de paciente misturado com PNP, e os resultados são geralmente expressos como a diferença entre os dois testes.

Valores de corte: para interpretar os resultados do anticoagulante lúpico, é necessário determinar valores de corte que definem positividade em todas as etapas. Primeiramente, os laboratórios devem determinar os valores de corte em uma população de indivíduos sadios de pelo menos 120 pessoas, definindo o ponto de corte como o percentil 99 após a rejeição de valores discrepantes (Devreese et al, 2020). No entanto, o número de 120 indivíduos normais para calcular os valores de corte pode ser difícil de obter para muitos laboratórios. Uma abordagem que requer menos voluntários é a transferência dos valores de corte recomendados pelo fabricante. Isso pressupõe que os pontos de corte do fabricante se baseiam em uma grande população de referência sadia com dados demográficos adequados, um método estatístico correto e uma combinação correta de reagentes e instrumentos (Castellone, 2017). Quando essas condições forem atendidas, os valores de corte do fabricante devem ser verificados antes da transferência, testando 20 voluntários sadios que representem a demografia da população local. Após rejeitar valores discrepantes e substituí-los por novos resultados de voluntários sadios, os resultados (da população sem valores discrepantes) devem ser comparados com o valor de corte sugerido.

Interferências e limitações: a proteína C reativa interfere *in vitro* no teste de TTPA por meio de sua afinidade por fosfolipídios, levando a resultados falso-positivos. Embora esse efeito não tenha sido observado no ensaio de dRVVT, ele pode variar entre os reagentes. Além disso, o aumento da atividade coagulante do FVIII está associado a um TTPA mais curto, gerando resultados falso-negativos. Níveis elevados de FVIII podem ser observados durante a gravidez, cirurgia, inflamação, malignidade e outras condições. O teste de anticoagulante lúpico durante o evento trombótico ou durante o tratamento anticoagulante não é recomendado (Devreese et al, 2020). As diretrizes mais recentes da ISTH não recomendam a pré-diluição de amostras para teste de anticoagulante lúpico na presença de AVKs (Devreese et al, 2020). Os DOACs inibem diretamente a trombina (por exemplo, dabigatrana) ou o FXa (por exemplo, apixabana, betrixabana, edoxabana e rivaroxabana) com vários efeitos nos testes de coagulação, levando à interpretação de resultados falso-negativos e falso-positivos. O TTPA e o TP devem ser realizados antes do início do teste de anticoagulante lúpico para obter mais informações sobre a amostra, mas isso não exclui a presença de DOACs ou HBPM.

Anticorpos Antifosfolipídios:

Como escolher o teste? Os anticorpos anticardiolipina e antibeta-2-glicoproteína 1 são identificados por imunoenaios de fase sólida. Os critérios de classificação da SAF indicam a medição desses anticorpos por ELISA padronizado. Contudo, técnicas alternativas de detecção para testes de anticorpos, como quimioluminescência, enzima fluorescente e imunoenaios de fluxo multiplex, estão disponíveis (Devreese et al, 2014). Em comparação com os métodos tradicionais de ELISA manual, as técnicas mais recentes são mais fáceis de usar e demonstram melhor precisão. Os ensaios diferem em termos de fase sólida, princípio de detecção, revestimento, fonte de antígenos e anticorpos, agentes bloqueadores para evitar ligações não específicas, protocolo de diluição, calibração e unidades (Devreese et al, 2014). Recomenda-se realizar os testes de acompanhamento do paciente no mesmo laboratório, visto que as plataformas não podem ser usadas de forma intercambiável.

Como realizar o teste? Soro ou PPP podem ser utilizados para testes de aCL e a2GPI (Devreese et al, 2018). A necessidade de realizar o teste em duplicata depende das características de desempenho do ensaio. O teste em duplicata é especialmente recomendado no caso de ELISAs manuais ou se a imprecisão inter e intraexecução do

ensaio for >10% (Devreese et al, 2014). Em cada execução, material de controle de qualidade interno precisa ser analisado em níveis de título relevantes. Curvas de calibração precisam ser determinadas em cada execução de ELISA ou para cada lote de reagentes em sistemas automatizados. Cada calibração deve ser avaliada e rejeitada quando não atender aos requisitos do fabricante ou quando o coeficiente de correlação entre os valores de teste e os valores alvo for menor que 0,90 (Devreese et al, 2014). Infelizmente, não há uniformidade no material de referência para calibração de testes. Esforços estão sendo feitos para desenvolver novos padrões monoclonais e policlonais para aCL e a2GPI, com o objetivo de criar padrões da OMS com UI/mL como unidade universal.

Valores de corte e perfil de anticorpos: o valor de 40 GPL/MPL como ponto de corte para aCL foi baseado em estudos que mostram melhor correlação deste ponto com a SAF (Levine et al, 1997). Porém, pode haver uma diferença acentuada entre 40 GPL/MPL e o percentil 99 para aCL (Vandeveldt et al, 2024). E a ISTH-SSC não recomenda o uso de 40 GPL/MPL como ponto de corte. Recomenda-se calcular um valor de corte para positividade específico do laboratório com base em um percentil 99 não paramétrico de pelo menos 120 indivíduos de referência. A rejeição de valores discrepantes com o método de Dixon/Reed é recomendada para evitar a superestimação dos valores de corte. Transferir os pontos de corte do fabricante após verificação em 20 ou mais indivíduos de referência é uma alternativa válida se o ponto de corte do fabricante for calculado em uma população de referência suficientemente grande e uma metodologia estatística apropriada tiver sido aplicada. Cada resultado de aCL e a2GPI acima do ponto de corte deve ser relatado como positivo, acompanhado do valor numérico e do valor de corte interno (Vandeveldt et al, 2024). Positividade em um dos testes (anticoagulante lúpico, aCL IgG, aCL IgM, a2GPI IgG ou a2GPI IgM) é suficiente para diagnosticar a SAF. A interpretação combinada de diferentes aPL como perfis de anticorpos foi sugerida para identificar pacientes de alto risco, em comparação com a avaliação individual. Em portadores assintomáticos de aPL, positividade dupla e tripla foi um fator de risco para o desenvolvimento de eventos trombóticos, mas positividade única de aCL ou a2GPI não foi (Mustonen et al, 2014).

Interferências: a presença do fator reumatoide pode gerar resultados falso-positivos de aCL IgM e a2GPI IgM (Devreese et al, 2014; Forastiero et al, 2014). Ao contrário dos ensaios de anticoagulante lúpico, o teste de anticorpos com imunoenaios de fase sólida não está sujeito a interferência analítica de reagentes de fase aguda ou terapia anticoagulante. No entanto, aumento transitório de aCL e a2GPI é observado em condições inflamatórias (Exner et al, 2020; Laureano e Crowthe, 2018).

Referências

Barbosa ACN, Montalvão SAL, Barbosa KGN, Colella MP, Annichino-Bizzacchi JM, Ozelo MC, De Paula EV. Prolonged APTT of unknown etiology: A systematic evaluation of causes and laboratory resource use in an outpatient hemostasis academic unit. *Res Pract Thromb Haemost* 2019; 3(4): 749-757.

Castellone DD. Establishing reference intervals in the coagulation laboratory. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 121-127.

Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, Erkan D, Favaloro EJ, Mackie I et al. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost* 2020; 18(11): 2828-2839.

Devreese KMJ, Ortel TL, Pengo V, de Laat B. Laboratory criteria for antiphospholipid syndrome: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 809-813.

Devreese KM, Pierangeli SS, de Laat B, Tripodi A, Atsumi T, Ortel TL. Testing for antiphospholipid antibodies with solid phase assays: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5): 792-795.

Exner T, Rigano J, Favaloro EJ. The effect of DOACs on laboratory tests and their removal by activated carbon to limit interference in functional assays. *Int J Lab Hematol* 2020; 42 Suppl 1: 41-48.

Favaloro EJ, Kershaw G, Mohammed S, Lippi G. How to optimize activated partial thromboplastin time (APTT) testing: Solutions to establishing and verifying normal reference intervals and assessing APTT reagents for sensitivity to heparin, lupus anticoagulant, and clotting factors. *Semin Thromb Hemost* 2019; 45(1): 22-35.

Forastiero R, Papalardo E, Watkins M, Nguyen H, Quirbach C, Jaskal K et al. Evaluation of different immunoassays for the detection of antiphospholipid antibodies: Report of a wet workshop during the 13th international Congress on Antiphospholipid Antibodies. *Clin Chim Acta* 2014; 428: 99-105.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the evaluation of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 1: Instrument-specific issues and commonly used coagulation screening tests. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(2): 169-183.

Gardiner C, Coleman R, de Maat MPM, Dorgalaleh A, Echenagucia M, Gosselin RC, Ieko M, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) laboratory guidance for the verification of haemostasis analyser-reagent test systems. Part 2: Specialist tests and calibrated assays. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(5): 907-916.

Harris EN, Gharavi AE, Patel SP, Hughes GR. Evaluation of the anti-cardiolipin antibody test: Report of an international workshop held 4 April 1986. *Clin Exp Immunol* 1987; 68(1): 215-222.

Laureano M, Crowther MA. Higher-risk aps: Do we dare to DOAC? *Blood* 2018; 132(13): 1357-1358.

Levine SR, Salowich-Palm L, Sawaya KL, Perry M, Spencer HJ, Winkler HJ, Alam Z, Carey JL. IgG anticardiolipin antibody titer > 40 GPL and the risk of subsequent thrombo-occlusive events and death. A prospective cohort study. *Stroke* 1997; 28(9): 1660-1665.

Miyakis S, Lockshin MD, Atsumi T, Branch DW, Brey RL, Cervera R et al. International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* 2006; 4(2): 295-306.

Mustonen P, Lehtonen KV, Javela K, Puurunen M. Persistent antiphospholipid antibody (aPL) in asymptomatic carriers as a risk factor for future thrombotic events: A nationwide prospective study. *Lupus* 2014; 23(14): 1468-1476.

Ruiz-Irastorza G, Crowther M, Branch W, Khamashta MA. Antiphospholipid syndrome. *Lancet* 2010; 376(9751): 1498-1509.

Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G, Salmon JE, Shoenfeld Y, Shovman O, Hunt BJ. Antiphospholipid syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4: 17103.

Vandevelde A, Gris JC, Moore GW, Musiał J, Zuily S, Wahl D, Devreese KMJ. Toward harmonized interpretation of anticardiolipin and anti- β 2-glycoprotein I antibody detection for diagnosis of antiphospholipid syndrome using defined level intervals and likelihood ratios: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibodies. *J Thromb Haemost* 2024; 22(8): 2345-2362.

PARTE 12 **Investigação Laboratorial de Fibrinólise**

Silmara Montalvão

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Tempo de Lise do Coágulo Plasmático Induzida por tPA ✓ Ensaio de Geração de Plasmina
-

Fibrinólise é uma série de reações enzimáticas que degradam a fibrina insolúvel e depende da quantidade e qualidade de várias enzimas fibrinolíticas, como o ativador do plasminogênio tecidual (tPA) e a plasmina, seus respectivos inibidores, o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) e a alfa-2-antiplasmina (α 2AP), bem como da estrutura do coágulo (Longstaff e Kolev, 2015). No cenário clínico, o aumento da taxa de fibrinólise é usado para reverter a oclusão trombótica (por exemplo, tPA recombinante para tratamento agudo de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio ou embolia pulmonar), enquanto a diminuição da taxa fibrinolítica é usada para reduzir o sangramento (por exemplo, ácido tranexâmico para tratamento agudo de acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio ou embolia pulmonar) (Draxler e Medcalf, 2015; Ilich et al, 2017; Kwaan et al, 2017). Recentemente, na hemofilia, ensaios que medem a formação de coágulo e a fibrinólise têm sido utilizados para facilitar comparações diretas e funcionais entre agentes hemostáticos novos e emergentes que apresentam diferentes mecanismos de ação (Holle et al, 2024). No entanto, testes globais para identificar o potencial fibrinolítico de um indivíduo não são amplamente implementados. Em contraposição, pesquisas básicas sobre fibrinólise geralmente se baseiam na quantificação dos vários fatores fibrinolíticos. As concentrações totais são medidas por meio de ensaios baseados em antígenos e testes funcionais específicos para determinar sua atividade. Apesar da variedade de ensaios disponíveis, continua sendo um desafio atribuir fatores fibrinolíticos individuais que contribuem para o resultado fibrinolítico geral em razão da natureza dinâmica do ambiente que envolve o coágulo (Longstaff, 2018). Durante décadas, ensaios de lise de coágulos monitorados por turbidez têm sido utilizados como método padrão para quantificar o potencial fibrinolítico geral de uma amostra, e variações desse ensaio global e simplista foram desenvolvidas para abordar as funções dos fatores fibrinolíticos. Nesse contexto, dois ensaios foram explorados na prática clínica e apresentam resultados promissores para uso na avaliação do potencial fibrinolítico geral.

Tempo de Lise do Coágulo Plasmático Induzida por tPA: os tempos de lise do coágulo plasmático induzida por ativador do plasminogênio são frequentemente relatados para avaliar e quantificar a propriedade fibrinolítica geral de uma amostra (Longstaff, 2018). Esse teste é realizado adicionando simultaneamente agonistas para iniciar a coagulação (por exemplo, fator tecidual e Ca^{2+}) e a fibrinólise (por exemplo, tPA) ao plasma citratado. Como alternativa, os coágulos podem ser gerados primeiro e depois cobertos com tPA para simular o cenário clínico no qual o tPA é infundido para degradar trombos isquêmicos existentes (Longstaff et al, 2011). A simplicidade do sistema de reação e o processamento mínimo da amostra fazem desse ensaio o método ideal para investigar a suscetibilidade de coágulos plasmáticos à fibrinólise (Holle et al, 2024). O teste também é sensível a moléculas inibidoras que têm como alvo fatores específicos, como PAI-1 e α 2AP, que podem ser incluídas para inferir os respectivos papéis de PAI-1 e α 2AP na fibrinólise geral (Zheng et al, 2023).

Reagentes e método:

- Fosfolípidios [4 μM final]
- CaCl_2 [10 mM final]
- Fator tecidual [dilução 1:15.000 de Innovin, fator tecidual 1 pM final]
- Solução salina tamponada com HEPES (HEPES 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM)
- tPA (0,5 $\mu\text{g/mL}$ final)

- 1) Em uma placa de 96 poços com fundo em U, pipete 10 μ L de TF/PL/rtPA em cada poço (pipetagem reversa para o fundo do poço)
- 2) Adicione 40 μ L de PPP em cada poço (pipetagem reversa para a lateral do poço na parte de cima)
- 3) Pré-aqueça a placa na incubadora por 5 minutos
- 4) Após 5 minutos de pré-aquecimento, use uma pipeta multicanal para transferir 10 μ L de Ca, misture bem e evite a formação de bolhas
- 5) Coloque a placa rapidamente no leitor de placas e inicie a leitura
- 6) Monitore a reação por 2 horas, medindo a turbidez a 405 nm a cada 12 segundos usando um leitor de placas.

Ensaio de Geração de Plasmina: os ensaios de geração de plasmina desenvolvidos por vários grupos compartilham alguns elementos comuns (Longstaff, 2018; Zheng et al, 2023). Em geral, a atividade pró-coagulante no ensaio de geração de plasmina é iniciada pela adição de fator tecidual exógeno ao plasma recalcificado, e a atividade fibrinolítica é desencadeada pela adição de tPA exógeno. A geração de plasmina é detectada pela clivagem de um substrato fluorogênico, e os parâmetros são definidos a partir do acúmulo de fluorescência ou por meio de uma derivada matemática dessa curva de fluorescência. Diferenças sutis entre esses ensaios incluem as concentrações de fator tecidual e tPA usadas e a utilização ou não de plasma diluído. Algumas variações desses ensaios detectam trombina e plasmina simultaneamente, enquanto outras realizam essas medições separadamente, mas em paralelo. Estudos mostram que esses ensaios são específicos para plasmina e sensíveis à α 2AP, com a atividade medida representando a plasmina livre. A geração de plasmina também é sensível ao ácido tranexâmico. Considerando as altas concentrações de tPA necessárias para desencadear a geração de plasmina mensurável, o teste não é sensível a concentrações plasmáticas de PAI-1 (Misztal et al, 2021). No entanto, a resposta de geração de plasmina à adição de tPA exógeno é dose-dependente. Um crescente corpo de estudos sugere que ensaios de geração de plasmina, especialmente quando usados com ensaios de geração de trombina e turbidez, produzem uma impressão multidimensional dos efeitos integrados das atividades pró-coagulante e fibrinolítica na saúde e na doença (Misztal et al, 2021; Zheng et al, 2023).

Reagentes e método:

- Solução salina tamponada com Tris (TBS), contendo 66 mM de Tris e NaCl 130 mM
 - 34 mM de CaCl_2
 - 10 pM de fator tecidual (fator tecidual humano recombinante lipídado, Innovin, Siemens Healthcare, Erlangen, Alemanha)
 - 900 ng/mL de tPA (ativador do plasminogênio tecidual de cadeia dupla recombinante, Actylise, Boehringer Ingelheim, Biberach an der Riss, Alemanha)
 - α -trombina (BOC-VAL-PrO-ARG-MCA, Peptides International, 5 mg)
 - Plasmina (BOC-GLU-LYS-LYS-MCA, Peptides International, 5 mg)
- 1) Prepare a solução reagente com 34 mM de CaCl_2 , 10 pM de fator tecidual e 900 ng/mL de tPA na solução TBS. A concentração final dos reagentes no plasma foi 5 pM de TF e 450 ng/mL de tPA.
 - 2) Dois substratos foram preparados com concentração final de 100 μ M e utilizados na detecção das enzimas: α -trombina e plasmina.
 - 3) Os dois primeiros poços da placa (Greiner, 96 poços, fundo plano, preto transparente) devem ser usados como branco, e as amostras foram analisadas em duplicata, em fileiras paralelas, para cada substrato, evitando possível interferência e/ou interação na detecção do sinal.
 - 4) Adicione soluções de substrato (20 μ L) aos poços da placa, seguido de 90 μ L das amostras e do branco (solução TBS).
 - 5) Utilizando uma pipeta automática com múltiplas ponteiros, adicione 90 μ L da solução de reação pré-aquecida (37°C por 3 min) a cada poço da placa.
 - 6) Por fim, a placa deve ser lida no fluorômetro com comprimento de onda de excitação de 340 nm e emissão de 450 nm por 4 horas em intervalos de 45 segundos.
 - 7) A análise de dados pode ser realizada pelo software Microsoft® Excel®. As curvas para trombina e plasmina devem ser geradas calculando a média em cada ponto de tempo para os poços de plasma duplicados,

subtraindo os valores de leitura do branco (para trombina e plasmina separadamente). Parâmetros a serem calculados nos dois ensaios, usando as ferramentas do aplicativo Shiny: início (tempo até o ponto de inflexão antes do aumento da turbidez), taxa máxima (inclinação de uma linha ajustada à taxa máxima de aumento da turbidez usando 5 a 10 pontos para determinar a linha), tempo até o platô/pico (tempo até o platô [formação de coágulo] ou pico [fibrinólise] de turbidez), alteração de turbidez (turbidez máxima do coágulo menos a turbidez inicial) e área sob a curva (AUC) (calculada como a soma dos trapézios formados pelas curvas de turbidez).

Referências

- Draxler DF, Medcalf RL. The fibrinolytic system-more than fibrinolysis? *Transfus Med Rev* 2015; 29(2): 102-109.
- Holle LA, Pantazis JC, Turecek PL, Wolberg AS. Clot formation and fibrinolysis assays reveal functional differences among hemostatic agents in hemophilia A plasma. *Res Pract Thromb Haemost* 2024; 8(1): 102337.
- Ilich A, Bokarev I, Key NS. Global assays of fibrinolysis. *Int J Lab Hematol* 2017; 39(5): 441-447.
- Kwaan H, Lisman T, Medcalf RL. Fibrinolysis: Biochemistry, clinical aspects, and therapeutic potential. *Semin Thromb Hemost* 2017; 43(2): 113-114.
- Longstaff C. Development of Shiny app tools to simplify and standardize the analysis of hemostasis assay data: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2017; 15(5): 1044-1046.
- Longstaff C. Measuring fibrinolysis: From research to routine diagnostic assays. *J Thromb Haemost* 2018; 16(4): 652-662.
- Longstaff C, Kolev K. Basic mechanisms and regulation of fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2015; 13 Suppl 1: S98-105.
- Longstaff C, Thelwell C, Williams SC, Silva MM, Szabó L, Kolev K. The interplay between tissue plasminogen activator domains and fibrin structures in the regulation of fibrinolysis: Kinetic and microscopic studies. *Blood* 2011; 117(2): 661-668.
- Miszta A, Huskens D, Donkervoort D, Roberts MJM, Wolberg AS, de Laat B. Assessing plasmin generation in health and disease. *Int J Mol Sci* 2021; 22(5): 1-17.
- Zheng Z, Mukhametova L, Boffa MB, Moore EE, Wolberg AS, Urano T, Kim PY. Assays to quantify fibrinolysis: Strengths and limitations. Communication from the International Society on Thrombosis and Haemostasis Scientific and Standardization Committee on fibrinolysis. *J Thromb Haemost* 2023; 21(4): 1043-1054.

TÓPICOS ABORDADOS

✓ Hemostasia do Desenvolvimento

✓ Parâmetros de Coagulação em Neonatos e Crianças
versus Adultos

O equilíbrio hemostático pediátrico, diferente do adulto, é um processo evolutivo conforme o sistema hemostático se modifica e amadurece da vida fetal até a vida adulta, principalmente durante os primeiros meses de vida. Compreender o conceito de hemostasia do desenvolvimento, hoje universalmente aceito, é fundamental para garantir o diagnóstico e o tratamento ideais de doenças hemorrágicas e trombóticas em crianças.

Hemostasia do Desenvolvimento: a hemostasia é um mecanismo complexo que envolve fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Ela permite que o sangue permaneça líquido ao circular em vasos intactos. Também evita o sangramento excessivo, promovendo a formação de coágulos após lesão endotelial, e a coagulação excessiva, limitando a formação de coágulos no local da lesão. O equilíbrio hemostático depende principalmente de muitos parâmetros, incluindo plaquetas, fatores de coagulação e inibidores, embora as células endoteliais e sanguíneas desempenhem um papel significativo. Crianças não são apenas adultos em miniatura, pelo menos no que diz respeito à hemostasia, pois o equilíbrio hemostático pediátrico é diferente do de adultos. Além disso, é um processo evolutivo, como demonstrado por Andrew M. et al (1987) há mais de 30 anos, tanto em recém-nascidos prematuros quanto em recém-nascidos a termo. Esses autores demonstraram que o sistema hemostático se modifica e amadurece ao longo do tempo, da vida fetal até a idade adulta, principalmente durante os primeiros meses de vida, e promoveram o conceito de hemostasia do desenvolvimento. Os fatores de coagulação de origem materna são incapazes de atravessar a barreira placentária devido ao seu tamanho. A síntese de fatores de coagulação pelo feto inicia-se precocemente (por exemplo, durante a quinta semana de gestação no caso do fibrinogênio), e o sangue se torna coagulável após onze semanas de gestação. As faixas de referência de parâmetros de coagulação para fetos foram estudadas em diferentes faixas etárias gestacionais, e os níveis plasmáticos medianos situaram-se entre 10% e 30% dos valores de adultos, dependendo do parâmetro avaliado, em fetos com idade entre 19 e 23 semanas, aumentando progressivamente para níveis entre 10% e 50% entre 30 e 38 semanas de gestação. Os achados iniciais de Andrew M et al (1987) foram confirmados por vários estudos que avaliaram diferentes populações pediátricas em diversas condições técnicas (ou seja, combinações de reagentes/analísadores). Os critérios de seleção dos indivíduos foram relativamente homogêneos entre os estudos; porém, alguns tiveram critérios de inclusão/exclusão e grupos etários ligeiramente diferentes. A principal diferença entre os estudos foi o número de indivíduos avaliados em cada faixa etária, que variou de 10 a mais de 500 indivíduos. O processo de coleta de amostras, um ponto-chave a ser considerado, visto que a coleta de sangue de bebês ou neonatos pode ser mais problemática do que em adultos, foi comparável nos diferentes estudos, com sangue coletado por punção venosa em tubos contendo citrato 3,2% (1 vol./9 vol.) usando agulhas de calibre 18 a 24, dependendo da idade dos pacientes. A maioria desses estudos se concentrou principalmente em ensaios de atividade para a maioria dos parâmetros envolvidos no sistema de coagulação, enquanto um estudo avaliou as concentrações de antígenos de vários analitos. Todos esses estudos mostraram que, ao nascimento, os níveis plasmáticos da maioria das proteínas de coagulação eram cerca de metade dos medidos em adultos, exceto FVIII:C e FVW, que são elevados, com os recém-nascidos prematuros apresentando níveis mais baixos do que os recém-nascidos a termo. Os valores de adultos foram atingidos entre alguns meses de idade e até mais de 16 anos para parâmetros específicos, como FVII ou proteína C da coagulação, conforme mostrado na Tabela 39. Embora a tendência global seja consistente entre os estudos, as diferenças nos valores absolutos provavelmente se devem a diferenças nos reagentes e/ou nos instrumentos utilizados para medir esses parâmetros, particularmente nos testes globais de coagulação, como TP

ou TTPA. Assim, o Subcomitê do Comitê Científico e de Padronização da ISTH recomenda que cada laboratório defina suas faixas de referência dependentes da idade, utilizando suas próprias condições técnicas. Para cumprir a diretriz C28A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), as faixas de referência devem ser estabelecidas testando pelo menos 30 indivíduos diferentes em cada faixa etária. A obtenção de plasma suficiente a partir de um grande número de crianças "aparentemente" saudáveis para a realização de inúmeros testes gera questões logísticas que estariam muito além da capacidade de muitos laboratórios. Para contornar essa dificuldade, é prática comum consultar dados da literatura levando em consideração condições técnicas idênticas, mesmo que o processo pré-analítico, e particularmente a coleta de sangue, possa ser diferente daquele utilizado em uma determinada instituição. As condições técnicas (ou seja, combinação de reagentes e instrumentos) utilizadas nas principais publicações são apresentadas na Tabela 40. A hemostasia primária foi menos estudada. Contudo, a contagem de plaquetas geralmente é normal ou elevada ao nascimento, atingindo os valores de adultos no período de 1 ano após aumentos transitórios. Apesar das plaquetas hiporreativas, particularmente no período neonatal, constatou-se que o tempo de sangramento e o tempo de fechamento plaquetário (PFA-100®) eram menores em recém-nascidos, sugerindo maior potencial hemostático. A normalização ocorreu antes do final do primeiro mês de vida. Em recém-nascidos, foram relatados níveis significativamente mais altos de FVW que depois diminuíram, atingindo os valores de adultos após 1 ano de vida, momento em que se observa um aumento significativo dos níveis plasmáticos nos grupos sanguíneos não O em comparação aos grupos sanguíneos O.

Conclusões

A compreensão do conceito de hemostasia do desenvolvimento, hoje universalmente aceito, é fundamental para garantir a prevenção, o diagnóstico e o tratamento ideais de doenças hemorrágicas e trombóticas em crianças. Portanto, é obrigatório que o laboratório utilize faixas de referência de parâmetros de coagulação específicas para cada idade. Parece impossível exigir que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência para cada parâmetro de coagulação em suas próprias condições técnicas, testando pelo menos 120 indivíduos saudáveis em cada faixa etária, conforme recomendado pela Diretriz EP 28-A3C do CLSI. Portanto, a melhor opção para um laboratório seria traduzir os achados da literatura em faixas de referência locais para neonatos e crianças, levando em consideração seu ambiente técnico específico. Nesse sentido, já foram disponibilizados dados de combinações de reagentes e analisadores de fabricantes atuais. No caso de novos fabricantes, estudos específicos e, de preferência, multicêntricos teriam que ser realizados para estabelecer as faixas de referência pediátricas específicas utilizando essas novas combinações de reagentes/analisadores.

Tabela 39. Parâmetros de coagulação em neonatos e crianças versus adultos: resumo dos resultados dos testes e efeito potencial na hemostasia (adaptado de Toulon et al, 2016)

Componente	Parâmetro	Período neonatal (valor médio)*	Normalização	Impacto na hemostasia
Hemostasia primária	Plaquetas FWW Tempo de fechamento plaquetário (PFA-100®)	Normais ou elevadas Elevado (153%)* Reduzido	1 A (após aumentos transitórios) 3 M 2-4 S	Hemostasia primária aumentada
Coagulação	FII, FVII, FIX, FX, FXI, FXII, PK, HMWK FV FVIII Fibrinogênio TP TTPa	Diminuído (40-66%)* Diminuído (37-54%)* Normal ou diminuído (70%)* Normal ou aumentado (100)* Normal** Prolongado ou normal Prolongado	1 A (até 16 A para FVII) 1 A 1 A (até 16 A) 1 M 1 A 1 A 1 A (até 16 A)	Potencial de coagulação diminuído
Inibidores naturais da coagulação	Antitrombina Proteína C Proteína S	Diminuída (63%) Diminuída (35%) Diminuída (36%)*	3 M 16 A 3 M	Potencial regulatório/inibitório diminuído
Fibrinólise	Plasminogênio alfa 2 antiplasmina tPA dímero D	Diminuído (36%)* Normal ou diminuída (85%)* Aumentado Aumentado	6 M 6 M 1 S 16 A	Atividade fibrinolítica aumentada

*Em porcentagem (%) dos valores de adultos, de Andrew M, et al. (1987); **Fibrinogênio fetal pode estar presente; M: mês; S: semana; A: ano

Tabela 40. Condições técnicas (marcas de instrumentos e reagentes) utilizadas nos principais estudos que relataram valores habituais dos parâmetros de coagulação em populações pediátricas (*indica instrumentos e/ou reagentes que não estão mais disponíveis comercialmente)

Autores	Instrumentos	Reagentes
Andrew et al (1987, 1988)	ACL (Werfen)*	Vários*
Flanders et al (2005, 2006)	STA-R (Stago) BCS (Siemens)	Principalmente Stago
Monagle et al (2006, 2011)	STA Compact (Stago)	Stago
Apple et al (2012)	BCS (Siemens) CA-1500 (Sysmex)	Siemens
Attard et al (2013)	Leitor de microplacas	Stago
Toulon et al (2016)	ACL TOP 500/700 (Werfen)	Siemens

Referências

- Andrew M. Developmental hemostasis: Relevance to hemostatic problems during childhood. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21(4): 341-356.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Powers P. Development of the human coagulation system in the full-term infant. *Blood* 1987; 70(1): 165-172.
- Andrew M, Paes B, Milner R, Johnston M, Mitchell L, Tollefsen DM, Castle V, Powers P. Development of the human coagulation system in the healthy premature infant. *Blood* 1988; 72(5): 1651-1657.
- Andrew M, Vegh P, Johnston M, Bowker J, Ofosu F, Mitchell L. Maturation of the hemostatic system during childhood. *Blood* 1992; 80(8): 1998-2005.
- Appel IM, Grimminck B, Geerts J, Stigter R, Cnossen MH, Beishuizen A. Age dependency of coagulation parameters during childhood and puberty. *J Thromb Haemost* 2012; 10(11): 2254-2263.
- Attard C, van der Straaten T, Karlaftis V, Monagle P, Ignjatovic V. Developmental hemostasis: Age-specific differences in the levels of hemostatic proteins. *J Thromb Haemost* 2013; 11(10): 1850-1854.
- Flanders MM, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for seven common coagulation assays. *Clin Chem* 2005; 51(9): 1738-1742.
- Flanders MM, Phansalkar AR, Crist RA, Roberts WL, Rodgers GM. Pediatric reference intervals for uncommon bleeding and thrombotic disorders. *J Pediatr* 2006; 149(2): 275-277.
- Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, Ceriotti F, Garg U, Horn P, Pasce A, Sine HE, Zakowski J. CLSI Document EP28-A3C. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. 2010; Vol.28, n°30.
- Ignjatovic V, Kenet G, Monagle P; Perinatal and Paediatric Haemostasis Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. Developmental hemostasis: Recommendations for laboratories reporting pediatric samples. *J Thromb Haemost* 2012; 10(2): 298-300.
- Lippi G, Franchini M, Montagnana M, Guidi GC. Coagulation testing in pediatric patients: The young are not just miniature adults. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33(8): 816-820.
- Monagle P, Barnes C, Ignjatovic V, Furmedge J, Newall F, Chan A et al. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. *Thromb Haemost* 2006; 95(2): 362-372.
- Monagle P, Massicotte P. Developmental haemostasis: Secondary haemostasis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2011; 16(6): 294-300.
- Roschitz B1, Sudi K, Köstenberger M, Muntean W. Shorter PFA-100 closure times in neonates than in adults: Role of red cells, white cells, platelets and von Willebrand factor. *Acta Paediatr* 2001; 90(6): 664-670.
- Toulon P. Developmental hemostasis: Laboratory and clinical implications. *Int J Lab Hematol* 2016; 38 Suppl 1: 66-77.
- Toulon P, Berruyer M, Brionne-François M, Grand F, Lasne D, Telion C, Arcizet J, Giacomello R, De Pooter N. Age dependency for coagulation parameters in pediatric populations. Results of a multicenter study aimed at defining the age-specific reference ranges. *Thromb Haemost* 2016(1); 116: 9-16.
- Williams MD, Chalmers EA, Gibson BE; Haemostasis and Thrombosis Task Force, British Committee for Standards in Haematology. The investigation and management of neonatal haemostasis and thrombosis. *Br J Haematol* 2002; 119(2): 295-309.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Características Moleculares de Genes e Proteínas Relacionados à Hemofilia
- ✓ Espectro de Variantes Causadoras de Hemofilia
- ✓ Outros Fenótipos Associados ao Gene F8
- ✓ Outros Fenótipos Associados ao Gene F9
- ✓ Proteção contra Trombose Venosa Profunda (TVP)
- ✓ Espectro de Abordagens Práticas Aplicadas em Testes Genéticos
- ✓ Nomenclatura Padronizada e Potencial Patogênico de Variantes

A análise genética da hemofilia é importante para definir a causa subjacente do distúrbio hemorrágico em indivíduos afetados e seus familiares. A compreensão da variante genética associada ao fenótipo pode ajudar a prever a gravidade do distúrbio, incluindo o risco de desenvolvimento de inibidores. Também auxilia na identificação de mulheres portadoras de hemofilia, às quais pode ser oferecido diagnóstico pré-natal. É importante que os indivíduos submetidos a investigação genética recebam aconselhamento genético adequado antes de qualquer teste. As recentes Diretrizes da WFH para Manejo da Hemofilia (3ª edição) (Srivastava et al, 2019) contêm um capítulo dedicado à avaliação genética de indivíduos com hemofilia A e hemofilia B. Esse capítulo do manual de laboratório descreve a base genética da hemofilia A e B e destaca a heterogeneidade de abordagens práticas atualmente disponíveis em todo o mundo que podem ser utilizadas para investigar as variantes genéticas subjacentes. Também descreve o uso de nomenclatura padronizada para a descrição de variantes genéticas e sua classificação de patogenicidade, além de destacar a importância de um laudo de interpretação claro e conciso que descreva o resultado genético e as implicações para o indivíduo e sua família.

Características Moleculares de Genes e Proteínas Relacionados à Hemofilia: as características moleculares dos genes da hemofilia, FVIII ou F8 de coagulação e FIX ou F9 de coagulação, são apresentadas na Tabela 41. A Tabela 41 mostra as coordenadas genômicas em GRCh38 (hg38), tamanho dos genes e localização citogenética de F8 e F9, sua complexidade de éxons (número de éxons), versões atualizadas e com curadoria de arquivos RefSeq (ou seja, NG..., NM..., NP...) e o tamanho molecular relevante dos principais transcritos de genes e suas isoformas polipeptídicas derivadas.

Tabela 41. Características moleculares dos genes F8 e F9

Símbolo oficial do HGNC	Nome do gene	Localização citogenética	GRCh38 (hg38) (coordenadas) NC_000023.11 (comprimento [pb])	RefSeq genômica (faixa de coordenadas)	Principal transcrito* RefSeq (comprimento [nts]) (éxons)	Principal proteína* RefSeq (comprimento [aa])	Nº OMIM
F8	Fator de coagulação VIII	Xq28	complemento (154.835.792-155.022.723) (186.931)	NG_011403.2 (5.001-191.932)	NM_000132.4 (9032) (26)	NP_000123.1 (2351)	300841
F9	Fator de coagulação IX	Xq27.1	(139.530.739-139.563.459) (32.720)	NG_007994.1 (5.001-37.723)	NM_000133.4 (2800) (8)	NP_000124.1 (461)	300746

HGNC: *HUGO Gene Nomenclature Committee* [Comitê de Nomenclatura de Genes da HUGO]. Comprimento [unidades]: [pb], pares de bases; [nts], nucleotídeos; [aa]; aminoácidos. *Apenas a variante de transcrição mais longa (mais significativa) e sua principal isoforma derivada são indicadas. OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*

(<https://omim.org/>); n°, número de acesso. Os dados foram coletados do NCBI (Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia), acessado em 18/01/2024 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). RefSeq indica arquivos de Sequência de Referência da plataforma do navegador do NCBI.

Ademais, a Tabela 42 apresenta as características mais relevantes das proteínas de coagulação FVIII e FIX. A Tabela 42 compila dados das principais isoformas das proteínas, da cartografia de aminoácidos (aa) de domínios de proteínas reconhecíveis (especificados pelo banco de dados UNIPROT) e de arquivos do banco de dados de proteínas (PDB) associados a modelos de estrutura 3D (coordenadas tridimensionais dos átomos de FVIIIa e FIXa).

Tabela 42. Características moleculares das proteínas fatores VIII e IX de coagulação

Símbolo da proteína	Nome da Proteína principal isoforma	Isoforma RefSeq (comprimento [aa])	N° UNIPROT*	Domínios de isoformas: UNIPROT (coordenadas de aa)	ID no PDB de estrutura 3D (coordenadas de aa)
FVIII	fator VIII de coagulação isoforma a preproteína	NP_000123.1 (2351)	P00451	Peptídeo sinal: (1-19) A1: F5/8 tipo A 1 (20-348) A2: F5/8 tipo A 2 (399-730) B: região B (760-1667) A3: F5/8 tipo A 3 (1713-2040) C1: F5/8 tipo C 1 (2040-2188) C2: F5/8 tipo C 2 (2193-2345)	Mature FVIIIa 2R7E. pdb** A: Cadeia pesada A1-A2 (Antiga 1-725) B: Cadeia leve A3-C1-C2 (Antiga 1689-2332)
FIX	fator IX de coagulação isoforma 1 preproteína	NP_000124.1 (461)	P00740	Peptídeo sinal: (1-28) – Propeptídeo: (29-46) Gla: rico em γ -carboxiglutamato (47-92) EGF1: EGF-like 1 ligado a Ca^{++} (93-129) EGF2: EGF-like 2 (130-171) Act_peptide: peptídeo de ativação (192-226) Tryp_SPC: serina protease semelhante à tripsina (227-457)	Homology model FIXa. pdb*** L: Cadeia leve Gla-EGF1-EGF2 (47-171) H: Cadeia pesada Tryp_SPC (227-461)

*Navegador para proteínas UNIPROT (URL: <https://www.uniprot.org/>). **Shen et al, 2008. ***Curadores do Projeto de Bancos de Dados de Variantes da EAHAD (Rallapalli et al, 2013; McVey et al, 2020). A maioria dos dados foi coletada dos Bancos de Dados de Variantes de Fatores de Coagulação da EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders* [Associação Europeia para Hemofilia e Distúrbios Associados]) (URL: <https://dbs.eahad.org/>), acessados em 18/01/2024. Códon e aminoácidos (aa) são numerados seguindo as regras da HGVS (ou seja, códon +1 que codifica o primeiro resíduo (Met) do polipeptídeo primário em FVIII e FIX). Na numeração antiga, códon/aminoácido +1 refere-se ao que codifica o primeiro aminoácido da proteína FVIII madura (excluindo 19 aa do peptídeo sinal) e da proteína FIX (excluindo 46 aa do peptídeo sinal e do propeptídeo). Embora a numeração da HGVS seja recomendada, a numeração antiga foi amplamente utilizada em publicações anteriores.

Espectro de Variantes Causadoras de Hemofilia: a maioria das variantes patogênicas que afetam o gene F8 causa hemofilia A, enquanto a maioria das variantes patogênicas de F9 causa hemofilia B. O banco de dados *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) (<https://www.omim.org>) compila um grande conjunto de informações abrangentes sobre genes humanos, indica variantes que afetam sua função e descreve e classifica seus fenótipos associados. O banco de dados OMIM indica que as variantes de F8 estão associadas a dois fenótipos diferentes: hemofilia A (#306700) e trombofilia 13 (ligada ao X, devido a defeito do FVIII) (#301071) (THPH13); enquanto de F9, a quatro fenótipos: hemofilia B (#306900), trombofilia 8 (ligada ao X, devido a defeito do FIX) (#300807) (THPH8), proteção contra trombose venosa profunda (TVP) (#300807) e sensibilidade à varfarina (#301052). A Tabela 43 e a Tabela 44, respectivamente, mostram o espectro de mutações no gene F8 causadoras de hemofilia A de acordo com

os níveis de atividade do FVIII de coagulação (FVIII:C), e mutações no gene F9 causadoras de hemofilia B, associadas aos níveis de FIX (FIX:C). As prevalências mais relevantes das variantes causadoras de hemofilia A e hemofilia B, listadas nas Tabelas 43 e 44, foram extraídas dos bancos de dados da *European Association for Haemophilia and Allied Disorders* (EAHAD). O banco de dados de variantes de F8 da EAHAD exclui inversões prevalentes associadas a hemofilia A grave envolvendo quase metade dos pacientes. Para apresentar uma prevalência imparcial de mutações causadoras de hemofilia A grave, suas frequências relativas foram combinadas levando em consideração as médias mundiais das inversões do íntron 22 (Inv22) de F8 relatadas por Antonarakis et al (1995) e aquelas estimadas para a inversão do íntron 1 (Inv1) de F8 a partir de uma série internacional de pacientes com hemofilia A (Rossetti et al, 2004) (Tabela 43).

Tabela 43. Variantes de F8 causadoras de hemofilia A mais típicas em pacientes hemizigotos a partir de fontes internacionais.

Tipo de variante por efeito	Não inversões Grave Nº casos (%)	Global Grave Nº casos (%)	Moderada Nº casos (%)	Leve Nº casos (%)	Referências
Missense	1418 (30,2)	(16,2)	1340 (79,9)	3048 (95,8)	F8_var_db EAHAD*
Indel in-frame	70 (1,5)	(0,8)	19 (1,1)	32 (1,0)	F8_var_db EAHAD*
Indel frameshift	1487 (31,7)	(17,0)	142 (8,5)	27 (0,9)	F8_var_db EAHAD*
Defeito de splicing	320 (6,8)	(3,7)	98 (5,8)	68 (2,1)	F8_var_db EAHAD*
Nonsense	968 (20,6)	(11,1)	59 (3,5)	4 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
Grande deleção (SV)	426 (9,1)	(4,9)	19 (1,1)	3 (0,1)	F8_var_db EAHAD*
Total de não inversões	4689 (100)	(53,7)	1677 (100)	3182 (100)	F8_var_db EAHAD*
Inv22 (SV) tipo 1		740 (35,4)			Antonarakis et al, 1995
Inv22 (SV) tipo 2		140 (6,7)			
Inv22 (SV) de outros tipos		25 (1,1)			
Total de Inv22		2093 (43,2)			
Inv1 (SV)		19 (3,1)			Rossetti et al, 2004
Total de Inv1		622 (3,1)			

SV indica variantes estruturais, incluindo variações do número de cópias (CNVs), como grandes deleções de F8 e grandes inversões de F8 (não CNVs), como a inversão do íntron 22 (Inv22) e a inversão do íntron 1 (Inv1). Os dados de pacientes não informativos com inversões de F8 foram obtidos dos bancos de dados da EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) que registram pacientes individuais. *Banco de dados de variantes de F8 (<http://f8-db.eahad.org/>).

A variante causadora de hemofilia A grave mais característica e recorrente em todo o mundo é a inversão do íntron 22 de F8, uma grande inversão perfeita de 600 kb mediada pela recombinação entre repetições invertidas de 10 kb (int22h ou h), que rompe a estrutura do F8 e impede o splicing normal de RNA entre os éxons 22 e 23 (Lakich et al, 1993; Naylor et al, 1993). Há uma cópia intragênica de int22h do F8 dentro do íntron 22 (h1) e duas cópias extragênicas (h2 e h3). Dependendo de qual cópia extragênica se recombina com a intragênica, a Inv22 apresenta padrão tipo 1 (h1/h3) ou padrão tipo 2 (h1/h2). A Inv22 se origina quase exclusivamente de células germinativas masculinas (Rossiter et al, 1995) e, conseqüentemente, a maioria das mães de pacientes com Inv22 é portadora (Tizzano et al, 1995). O mecanismo molecular da recombinação homóloga não alélica entre grandes repetições invertidas na meiose masculina corrobora a recorrência da Inv22 como a causa mais prevalente de hemofilia A grave em todo o mundo (Tabela 43). Da mesma forma, a inversão do íntron 1 (Inv1) de F8 é uma grande inversão perfeita de DNA causada pela recombinação entre repetições invertidas de 1 kb (int1h), que rompe a estrutura do F8 no íntron 1 (Bagnall et al, 2001) e envolve uma média estimada de 3% dos pacientes com hemofilia A grave em todo o mundo (Tabela 43).

O grupo restante de pacientes com hemofilia A grave, moderada ou leve (Tabela 43), não informativos para as inversões de F8, e todos os pacientes com hemofilia B (Tabela 44) mostram um espectro típico de variantes deletérias, incluindo substituições de nucleotídeo único (SNV) prevendo missense, nonsense ou defeitos de splicing; pequenas inserções/deleções (INDEL) prevendo frameshifts ou alterações in-frame; ou, menos frequentemente, grandes variações do número de cópias (CNVs), principalmente grandes deleções.

Tabela 44. Variantes de F9 causadoras de hemofilia B mais típicas em pacientes hemizigotos a partir de fontes internacionais

Tipo de variante por efeito	Grave N° casos (%)	Moderada N° casos (%)	Leve N° casos (%)	Referências
Missense	999 (52,3)	1039 (85,1)	719 (95,0)	F9_var_db EAHAD*
Indel in-frame	27 (1,4)	9 (0,7)	1 (0,1)	F9_var_db EAHAD*
Indel frameshift	185 (9,7)	42 (3,4)	2 (0,3)	F9_var_db EAHAD*
Defeito de splicing	135 (7,1)	66 (5,8)	30 (4,0)	F9_var_db EAHAD*
Nonsense	459 (24,0)	62 (5,1)	5 (0,7)	F9_var_db EAHAD*
Grande deleção (SV)	107 (5,6)	3 (0,3)		F9_var_db EAHAD*
Total	1912 (100)	1221 (100)	757 (100)	F9_var_db EAHAD*

SV indica variantes estruturais como grandes deleções que afetam parcial ou totalmente o gene F9. Os dados de pacientes com HB foram obtidos dos bancos de dados da EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) que registram pacientes individuais. *Banco de dados de variantes de F9 (<https://f9-db.eahad.org/>).

Informações sobre as variantes de F8 e F9 estão compiladas em bancos de dados de acesso público, como os desenvolvidos pelos CDC (*Centers for Disease Control and Prevention* [Centros de Controle e Prevenção de Doenças]), denominados CHAMP e CHBMP para hemofilia A e hemofilia B, respectivamente (<https://www.cdc.gov/ncbddd/hemophilia/champs.html>), e pela EAHAD (*European Association for Haemophilia and Allied Disorders*) para F8 (<http://f8-db.eahad.org/>) e F9 (<http://f9-db.eahad.org/>) (Tabelas 43 e 44). Acessados em 18 de janeiro de 2024, os bancos de dados da EAHAD contêm informações de 3052 variantes de F8 únicas que correspondem a 10144 casos individuais e 1244 variantes de F9 únicas que correspondem a 4713 casos individuais. Nas Tabelas 43 e 44, as variantes genéticas são classificadas por seu efeito previsto a partir da evidência observada da sequência de nucleotídeos de DNA (ou seja, missense, indel in-frame, indel frameshift, defeito de splicing, nonsense, grande deleção). As variantes de F8 e F9, respectivamente, listadas nas Tabelas 43 e 44 representam as variantes causadoras de hemofilia com frequências significativas em todo o mundo, em contraposição às variantes prevalentes encontradas em populações específicas tipicamente associadas a fenótipos não graves (por exemplo, duplicação do éxon 13 de F8 prevalente na população italiana com hemofilia A leve (Acquila et al, 2004).

Outros Fenótipos Associados ao Gene F8

Trombofilia 13 (ligada ao X, devido a defeito do FVIII): Shen et al (2013) avaliaram os níveis de atividade de FVIII:C e o número de cópias do gene F8 em pacientes com tromboembolismo venoso (TEV) em comparação a controles saudáveis. Pacientes com TEV apresentaram níveis significativamente mais altos de FVIII:C e maior número de cópias do gene F8. Simioni et al (2021) relataram duas famílias italianas com trombofilia 13 e identificaram uma duplicação parcial do gene F8 em tandem, o que é consistente com o padrão de herança dominante ligada ao cromossomo X, visto que pacientes hemizigotos do sexo masculino são mais gravemente afetados do que as portadoras do sexo feminino.

Outros Fenótipos Associados ao Gene F9

A trombofilia 8 (devido a defeito do FIX) é um fenótipo hereditário recessivo ligado ao X associado a TEV de início precoce causado por um defeito missense de F9, R338L ou variante Padua, relatado por Simioni et al (2009). Foi relatado que FIX-Padua aumenta a resistência fibrinolítica dos coágulos plasmáticos (Ammollo et al, 2014).

Proteção contra Trombose Venosa Profunda (TVP):

A variante polimórfica comum FIX-Mälmo (frequência alélica menor de 0,32), p.(Thr148Ala), causada por uma substituição de nucleotídeo único (SNV) G>A, está associada a proteção contra o risco de TVP com razões de chances (OR) de 0,8 em pacientes do sexo masculino e 0,89 em pacientes do sexo feminino (Bezemer et al, 2008). No entanto, os mecanismos moleculares de proteção contra TVP conferidos pelo polimorfismo FIX-Mälmo permanecem desconhecidos.

A varfarina é um anticoagulante amplamente prescrito para a prevenção de eventos tromboembólicos em pacientes "de risco". Sensibilidade à varfarina (ligada ao X, devido a variantes do FIX) refere-se a uma complicação do fenótipo hemorrágico durante a terapia anticoagulante com antagonistas da vitamina K. Pezeshkpoor et al (2018) relataram uma associação entre variantes missense de F9 que afetam o propeptídeo, como p. (Ala37Thr) e p.(Ala37Val), e a sensibilidade à varfarina, caracterizada por uma redução desproporcional dos níveis de FIX:C durante a terapia anticoagulante.

A relação causal entre uma determinada variante genética (por exemplo, Inv22 de F8) e um fenótipo específico (por exemplo, hemofilia A grave em paciente hemizigoto) pode ser modificada em casos raros pelo envolvimento de um mosaïcismo genético (GM), que é definido como a coexistência de pelo menos dois clones geneticamente diferentes em um indivíduo (por exemplo, células Inv22-positivas e negativas). O GM pode envolver, parcial ou totalmente, alguns ou todos os órgãos/tecidos de um indivíduo afetado, resultando, por exemplo, em fenótipos mais brandos se afetar células somáticas (por exemplo, células produtoras de FVIII/FIX derivadas do endotélio hepático) e na herdabilidade da variante genética se afetar células germinativas (por exemplo, um paciente com hemofilia e mosaico germinativo pode ser pai de filhas não portadoras) (Abelleyro et al, 2018).

Como paradigmas históricos de distúrbios recessivos ligados ao cromossomo X, a hemofilia A (OMIM #306700) e a hemofilia B (OMIM #306900) são tipicamente expressas em pacientes hemizigotos do sexo masculino (46,XY), enquanto as mulheres heterozigotas (46,XX) são geralmente assintomáticas. Segundo um ponto de vista consensual entre hematologistas, uma nova classificação da hemofilia feminina considera os níveis de atividade do fator de coagulação, indicando doença grave quando <1 UI/dL, moderada 1-5 UI/dL e leve 5-40 UI/dL; e quando os níveis do fator são >40 UI/dL, os indivíduos são classificados como portadores sintomáticos e assintomáticos (van Galen et al, 2021). A base molecular da hemofilia feminina envolve expressão prejudicada ou silenciamento dos alelos de F8 ou F9 mediado pelo fenômeno de inativação do cromossomo X (XCI), que silencia a expressão gênica em cis de um X em cada célula para compensar as doses nos homens. A XCI ocorre no início da embriogênese, normalmente de forma aleatória em cada célula, e esse estado é herdado clonalmente na vida adulta das mulheres. Espera-se que uma portadora homozigota e uma heterozigota composta expressem hemofilia, assim como portadoras heterozigotas com XCI desviada silenciando preferivelmente o alelo normal (Radic et al, 2015). Além disso, Garagiola et al (2021) comprovaram uma associação significativa entre os níveis de atividade de coagulação do FVIII/FIX e o padrão de XCI medido em leucócitos do sangue periférico de portadores heterozigotos de hemofilia A com ≤50 UI/dL.

Espectro de Abordagens Práticas Aplicadas em Testes Genéticos: dependendo da disponibilidade de recursos e expertise, há uma variedade de técnicas que podem ser empregadas para a investigação de variantes genéticas associadas a hemofilia A e hemofilia B. Este capítulo fornece exemplos dessas abordagens práticas e referências, quando disponíveis. Diversas técnicas diferentes estão disponíveis para a investigação da inversão do íntron 22 de F8, incluindo Southern blot, reação em cadeia da polimerase (PCR) longa e PCR inversa (Lakich et al, 1993; Liu et al, 1998; Bagnall et al, 2006; Rossetti et al, 2008; Abelleyro et al, 2016; Ding et al, 2016; Hudecova et al, 2017; Pan et al, 2014; Kumar et al, 2015; Edison et al, 2016). A inversão do íntron 1 de F8 pode ser detectada por técnicas como PCR dupla ou PCR inversa (Bagnall et al, 2002; Rossetti et al, 2008). A análise de SNVs nos genes F8 e F9 pode ser realizada por uma variedade de técnicas, incluindo PCR e sequenciamento de Sanger, ou tecnologias de sequenciamento de alto rendimento, como sequenciamento de última geração (NGS) (Al-Allaf et al, 2019; Li et al, 2014; Lyu et al, 2016; Manderstedt et al, 2019; Edison et al, 2016). Quando os recursos forem limitados, uma abordagem de triagem antes do sequenciamento de Sanger pode ser empregada (Salviato et al, 2019), como a análise heteroduplex usando eletroforese em gel sensível à conformação (CSGE). Para análise de CNVs nos genes F8 e F9 existem várias técnicas, como gap-PCR, amplificação de sonda dependente de ligação multiplex (MLPA), PCR quantitativa em tempo real e NGS (Rossetti et al, 2004; Payne et al, 2012; Costa et al, 2004; Belvini et al, 2017; Kinkle et al, 2017; You et al, 2013; Wu

et al, 2014; Fernandez-Lopez et al, 2007; Tizzano et al, 2005; Johnsen et al, 2017). Nos casos de hemofilia A e hemofilia B em que uma variante genética subjacente não é encontrada nas regiões essenciais dos genes F8 ou F9 por meio das técnicas descritas acima, a análise de regiões intrônicas profundas quanto a possíveis defeitos de splicing pode estar disponível por sequenciamento paralelo em massa (MPS) dirigido ou sequenciamento do genoma completo (WGS) (Jourdy et al, 2018; Jourdy et al, 2020; Bach et al, 2015; Inaba et al, 2017; Castaman et al, (2011; Chang et al, 2019). A análise de ligação também pode ser considerada para estudos familiares em que não há variante de F8 ou F9 identificável (Sun et al, 2015). A investigação de indivíduos com fenótipos atípicos que podem ser decorrentes de rearranjos genômicos complexos pode ser feita por análise de microarranjo citogenético (Jourdy et al, 2016; Jourdy et al, 2017; Janczar et al, 2016; Lannoy et al, 2018). A análise da inativação do cromossomo X pode ser realizada por diversas técnicas, como enzima de restrição específica para metilação, PCR e análise de fragmentos, ou outras técnicas quantitativas (Nisen et al, 1989; Coleman et al, 1993; Johansson et al, 2023; Machado et al, 2014).

Nomenclatura Padronizada e Potencial Patogênico de Variantes: a exatidão na descrição unívoca das variantes genéticas é essencial para a pesquisa e o tratamento clínico. Para atender a essa exigência, o *Variant Nomenclature Committee (HVNC)* [Comitê de Nomenclatura de Variantes] da *Human Genome Variation Society (HGVS)* [Sociedade de Variação do Genoma Humano], com o apoio da *Human Genome Organization (HUGO)* [Organização do Genoma Humano], desenvolveu um conjunto de recomendações. Estas incluem a descrição das variantes genéticas no nível mais básico, o nível do DNA, e descrições no nível de RNA e/ou proteína, geralmente previstas a partir de evidências do DNA, podem também ser fornecidas (<https://hgvs-nomenclature.org/stable/>) (den Dunnen et al, 2016). A nomenclatura da HGVS recomenda uma numeração específica para as posições dos genes, indicando o códon +1 que codifica o primeiro resíduo (Met) do polipeptídeo primário e o nucleotídeo +1 para o A do códon de iniciação AUG. Em algumas publicações anteriores sobre hemofilia, a numeração antiga do códon/aminoácido +1 refere-se à codificação do primeiro aminoácido da proteína madura (ou seja, na numeração da HGVS, códon 20 do FVIII e códon 47 do FIX). Para ajustar e normalizar a nomenclatura das variantes de acordo com a HGVS, o site Mutalyzer oferece algoritmos eficientes para verificar e confirmar a descrição correta a partir das recomendações da HGVS (<https://mutalyzer.nl/>) (Lefter et al, 2021). Todas as variantes detectadas devem ser classificadas de acordo com seu potencial de causar o fenótipo observado, de acordo com as diretrizes elaboradas pelo *American College of Medical Genetics and Genomics/ Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP)* [Colégio Americano de Genética Médica e Genômica/ Associação de Patologia Molecular] (Richards et al, 2015). As recomendações do ACMG podem ser aplicadas a testes genéticos convencionais ou baseados em sequenciamento de última geração utilizados em laboratórios clínicos e compreendem um sistema de classificação de cinco níveis de variantes relevantes para distúrbios mendelianos: (1) patogênicas, (2) provavelmente patogênicas, (3) significância incerta, (4) provavelmente benignas e (5) benignas. Para obter essa categorização, o ACMG/AMP recomenda uma análise completa de (a) dados populacionais, (b) dados computacionais, (c) dados funcionais e (d) dados de segregação.

Por exemplo, a análise das variantes de F8 e F9 envolve:

(a) O estudo da variante genotipada na população geral e sua frequência em indivíduos hemizigotos, heterozigotos, etc., consultando o gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), o ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e os bancos de dados específicos dos genes F8/HA e F9/HB, como o da EAHAD e o CHAMP (mencionados acima).

(b) A aplicação de ferramentas bioinformáticas in silico para analisar alterações missense prevendo eventuais alterações estruturais ou funcionais por meio de, por exemplo, PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), MutationTaster (<https://www.mutationtaster.org/>) e Varsome (<https://varsome.com/>), entre outras; ou para avaliar eventuais defeitos de splicing, como NNSplice (https://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), NetGene2 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetGene2-2.42/>) e ESEFinder para pesquisar diferenças em sequências de acentuadores de splicing exônico (esefinder.ahc.umn.edu); e muitas outras ferramentas computacionais para estimar o impacto de variantes no promotor, 5'- ou 3'-UTR, etc.

(c) Dados experimentais obtidos de estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* da versão mutada versus normal a ser testada, ou parte dela, fornecem informações significativas para estabelecer o impacto de uma variante genética.

(d) Dados de segregação associados a um modo de herança recessiva ligada ao cromossomo X e cossegregação com hemofilia em vários membros familiares afetados são indicativos de patogenicidade. Levando em consideração essa análise, o ACMG/AMP indica os critérios para classificar variantes patogênicas que pontuam a evidência como muito forte (PVS), forte (PS), moderada (PM) e de suporte (PP); e os critérios para classificar o impacto benigno ou neutro de variantes que pontuam a evidência como independente (BA), forte (BS) e de suporte (BP). A classificação final em uma categoria para estimar a patogenicidade (1-5) resulta da combinação das pontuações de evidência P_ e B_ (Richards et al, 2015).

Laudos de Interpretação: os laudos de interpretação devem ser claros e concisos e abordar o diagnóstico da pessoa em investigação. Além de seu foco principal, que é declarar a conclusão molecular geral em resposta à questão genética, o laudo de interpretação deve incluir detalhes suficientes para permitir a identificação da variante em outros laboratórios (ou seja, indicar as abordagens práticas utilizadas, as limitações das técnicas, a sequência genômica de referência utilizada e a classificação da patogenicidade de acordo com as diretrizes do ACMG, incluindo as evidências aplicadas para classificação e referências; ACGS reporting guidelines, 2020; Deans et al, 2022; Claustres et al, 2014; Gomez et al, 2019). Os laudos de interpretação devem incluir informações que expliquem a extensão real do diagnóstico molecular em linguagem simples, com indicação clara, por exemplo, dos riscos específicos para o desenvolvimento de fenótipos específicos na família.

Garantia de qualidade: em testes genéticos, a garantia de qualidade abrange todos os aspectos do processo de diagnóstico, desde a extração de ácido nucleico e procedimentos analíticos até a classificação e descrição das variantes detectadas e a produção de um laudo de interpretação. Controle de qualidade interno (CQI) dos testes genéticos deve ser realizado rotineiramente para garantir a validade dos resultados gerados. Existem programas formais de EQA para garantir que o processo de diagnóstico e os procedimentos de relato estejam em conformidade com outros laboratórios (por exemplo, a Avaliação de Qualidade Genômica [GenQA] e, especificamente para a avaliação genética da hemofilia, o Programa de Avaliação Externa de Qualidade Nacional do Reino Unido [NEQAS RU] para Coagulação Sanguínea). Os laboratórios de genética devem passar por acreditação periódica, se disponível, de acordo com normas acordadas internacionalmente, por um organismo aprovado. Isto garante a prestação de serviços de diagnóstico genético de alta qualidade.

Referências

- Abelleyro MM, Rossetti LC, Curto Mde L, Radic CP, Marchione VD, De Brasi CD. F8 intron 22 inversions and SNP rs73563631 in unrelated families with severe haemophilia A: Clinical features and gene testing implications. *Thromb Haemost* 2016; 115(3): 678-681.
- Abelleyro MM, Marchione VD, Elhelou L, Radic CP, Rossetti LC, Neme D, De Brasi CD. Somatic/germinal mosaicism of a F8 promoter deletion confounds clinical predictions in a family with haemophilia A: Key role of genotype quantitation. *Thromb Haemost* 2018; 118(3): 617-620.
- Acquila M, Pasino M, Lanza T, Bottini F, Molinari AC, Bicocchi MP. Duplication of exon 13 causes one third of the cases of mild hemophilia A in northern Italy. *Haematologica* 2004; 89(6): 758-759.
- Al-Allaf FA, Abduljaleel Z, Bogari NM, Owaidah TMA, Taher MM, Athar M et al. Identification of six novel factor VIII gene variants using next generation sequencing and molecular dynamics simulation. *Acta Biochim Pol* 2019; 66(1): 23-31.
- Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M, Simioni P. Factor IX-Padua enhances the fibrinolytic resistance of plasma clots. *Thromb Haemost* 2014; 111(2): 226-232.
- Antonarakis SE, Rossiter JP, Young M, Horst J, de Moerloose P, Sommer SS et al. Factor VIII gene inversions in severe hemophilia A: Results of an international consortium study. *Blood* 1995; 86(6): 2206-2212.
- Association for Clinical Genomic Science. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease. 2020. <https://www.acgs.uk.com/quality/best-practice-guidelines/>.
- Bach JE, Wolf B, Oldenburg J, Müller CR, Rost S. Identification of deep intronic variants in 15 haemophilia A patients by next generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Thromb Haemost* 2015; 114(4): 757-767.

Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: A novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost*. 2006; 4(3): 591-598.

Bagnall RD, Waseem N, Green PM, Giannelli F. Recurrent inversion breaking intron 1 of the factor VIII gene is a frequent cause of severe hemophilia A. *Blood* 2002; 99(1): 168-174.

Castaman G, Giacomelli SH, Mancuso ME, D'Andrea G, Santacroce R, Sanna S, Santagostino E, Mannucci PM, Goodeve A, Rodeghiero F. Deep intronic variations may cause mild hemophilia a. *J Thromb Haemost* 2011; 9(8): 1541-1548.

Chang CY, Perng CL, Cheng SN, Hu SH, Wu TY, Lin SY, Chen YC. Deep intronic variant c.5999-277G>A of F8 gene may be a hot spot mutation for mild hemophilia A patients without mutation in exonic DNA. *Eur J Haematol* 2019; 103(1): 47-55.

Claustres M, Kožich V, Dequeker E, Fowler B, Hehir-Kwa JY, Miller K et al. Recommendations for reporting results of diagnostic genetic testing (biochemical, cytogenetic and molecular genetic). *Eur J Hum Genet* 2014; 22(2): 160-170.

Coleman R, Genet SA, Harper JI, Wilkie AO. Interaction of incontinentia pigmenti and factor VIII mutations in a female with biased X inactivation, resulting in haemophilia. *J Med Genet* 1993; 30(6): 497-500.

Deans ZC, Ahn JW, Carreira IM, Dequeker E, Henderson M, Lovrecic L, Öunap K, Tabiner M, Treacy R, van Asperen CJ. Recommendations for reporting results of diagnostic genomic testing. *Eur J Hum Genet* 2022; 30(9): 1011-1016.

den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PE. HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat* 2016; 37(6): 564-569.

Ding Q, Wu X, Lu Y, Chen C, Shen R, Zhang X, Jiang Z, Wang X. AccuCopy quantification combined with pre-amplification of long-distance PCR for fast analysis of intron 22 inversion in haemophilia A. *Clin Chim Acta* 2016; 458: 78-83.

Edison E, Konkole BA, Goodeve AC. Genetic analysis of bleeding disorders. *Haemophilia* 2016; 22 Suppl 5(Suppl 5): 79-83.

Garagiola I, Mortarino M, Siboni SM, Boscarino M, Mancuso ME, Biganzoli M, Santagostino E, Peyvandi F. X chromosome inactivation: A modifier of factor VIII and IX plasma levels and bleeding phenotype in haemophilia carriers. *Eur J Hum Genet* 2021; 29(2): 241-249.

Gomez K, Laffan M, Keeney S, Sutherland M, Curry N, Lunt P. Recommendations for the clinical interpretation of genetic variants and presentation of results to patients with inherited bleeding disorders. A UK Haemophilia Centre Doctors' Organisation Good Practice Paper. *Haemophilia* 2019; 25(1): 116-126.

Hudecova I, Jiang P, Davies J, Lo YMD, Kadir RA, Chiu RWK. Noninvasive detection of F8 int22h-related inversions and sequence variants in maternal plasma of hemophilia carriers. *Blood* 2017; 130(3): 340-347.

Inaba H, Shinozawa K, Amano K, Fukutake K. Identification of deep intronic individual variants in patients with hemophilia A by next-generation sequencing of the whole factor VIII gene. *Res Pract Thromb Haemost* 2017; 1(2): 264-274.

Janczar S, Kosinska J, Ploski R, Pastorczak A, Wegner O, Zalewska-Szewczyk B, Paige AJ, Borowiec M, Mlynarski W. Haemophilia A and cardiovascular morbidity in a female SHAM syndrome carrier due to skewed X chromosome inactivation. *Eur J Med Genet* 2016; 59(1): 43-47.

Johansson J, Lidéus S, Höijer I, Ameer A, Gudmundsson S, Annerén G, Bondeson ML, Wilbe M. A novel quantitative targeted analysis of X-chromosome inactivation (XCI) using nanopore sequencing. *Sci Rep* 2023; 13(1): 12856.

Jourdy Y, Chatron N, Carage ML, Fretigny M, Meunier S, Zawadzki C, Gay V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Study of six patients with complete F9 deletion characterized by cytogenetic microarray: Role of the SOX3 gene in intellectual disability. *J Thromb Haemost* 2016; 14(10): 1988-1993.

Jourdy Y, Chatron N, Fretigny M, Carage ML, Chambost H, Claeysens-Donadel S, Roussel-Robert V, Negrier C, Sanlaville D, Vinciguerra C. Molecular cytogenetic characterization of five F8 complex rearrangements: Utility for haemophilia A genetic counselling. *Haemophilia* 2017; 23(4): e316-e323.

Jourdy Y, Fretigny M, Lassalle F, Lillicrap D, Négrier C, Vinciguerra C. The highly prevalent deletions in F8 intron 13 found in French mild hemophilia a patients result from both founder effect and recurrent de novo events. *J Thromb Haemost* 2020; 18(5): 1087-1093.

- Jourdy Y, Janin A, Fretigny M, Lienhart A, Négrier C, Bozon D, Vinciguerra C. Recurrent F8 intronic deletion found in mild hemophilia A causes Alu exonization. *Am J Hum Genet* 2018; 102(2): 199-206.
- Kumar P, Husain N, Soni P, Faridi NJ, Goel SK. New protocol for detection of intron 22 inversion mutation from cases with hemophilia A. *Clin Appl Thromb Hemost* 2015; 21(3): 255-259.
- Lakich D, Kazazian HH, Jr., Antonarakis SE, Gitschier J. Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nat Genet* 1993; 5(3): 236-241.
- Lannoy N, Hermans C. Review of molecular mechanisms at distal Xq28 leading to balanced or unbalanced genomic rearrangements and their phenotypic impacts on hemophilia. *Haemophilia* 2018; 24(5): 711-719.
- Lefter M, Vis JK, Vermaat M, den Dunnen JT, Taschner PEM, Laros JFJ. Mutalyzer 2: Next generation HGVS nomenclature checker. *Bioinformatics* 2021; 37(18): 2811-2817.
- Li T, Miller CH, Driggers J, Payne AB, Ellingsen D, Hooper WC. Mutation analysis of a cohort of US patients with hemophilia B. *Am J Hematol* 2014; 89(4): 375-379.
- Liu Q, Nozari G, Sommer SS. Single-tube polymerase chain reaction for rapid diagnosis of the inversion hotspot of mutation in hemophilia A. *Blood* 1998; 92(4): 1458-1459.
- Lyu C, Xue F, Liu X, Liu W, Fu R, Sun T et al. Identification of mutations in the F8 and F9 gene in families with haemophilia using targeted high-throughput sequencing. *Haemophilia* 2016; 22(5): e427-e434.
- Machado FB, Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, Alves da Silva AF, Radic CP et al. 5mCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. *PLoS One* 2014; 9(7): e103714.
- Manderstedt E, Nilsson R, Lind-Halldén C, Ljung R, Astermark J, Halldén C. Targeted re-sequencing of F8, F9 and VWF: Characterization of Ion Torrent data and clinical implications for mutation screening. *PLoS One* 2019; 14(4): e0216179.
- McVey JH, Rallapalli PM, Kembell-Cook G, Hampshire DJ, Giansily-Blaizot M, Gomez K, Perkins SJ, Ludlam CA. The European Association for Haemophilia and Allied Disorders (EAHAD) Coagulation Factor Variant Databases: Important resources for haemostasis clinicians and researchers. *Haemophilia* 2020; 26(2): 306-313.
- Nisen PD, Waber PG. Nonrandom X chromosome DNA methylation patterns in hemophiliac females. *J Clin Invest* 1989; 83(4): 1400-1403.
- Pan TY, Chiou SS, Wang CC, Wu SM. Separation of intron 22 inversion type 1 and 2 of hemophilia A by modified inverse-shifting polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis. *Talanta* 2014; 130: 328-335.
- Pezeshkpoor B, Czogalla KJ, Caspers M, Berkemeier AC, Liphardt K, Ghosh S, Kellner M, Ulrich S, Pavlova A, Oldenburg J. Variants in FIX propeptide associated with vitamin K antagonist hypersensitivity: Functional analysis and additional data confirming the common founder mutations. *Ann Hematol* 2018; 97(6): 1061-1069.
- Radic CP, Rossetti LC, Abelleiro MM, Tetzlaff T, Candela M, Neme D et al. Phenotype-genotype correlations in hemophilia A carriers are consistent with the binary role of the phase between F8 and X-chromosome inactivation. *J Thromb Haemost* 2015; 13(4): 530-539.
- Rallapalli PM, Kembell-Cook G, Tuddenham EG, Gomez K, Perkins SJ. An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B. *J Thromb Haemost* 2013; 11(7): 1329-1340.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015; 17(5): 405-424.
- Rossetti LC, Candela M, Bianco RP, de Tezanos Pinto M, Western A, Goodeve A, Larripa IB, De Brasi CD. Analysis of factor VIII gene intron 1 inversion in Argentinian families with severe haemophilia A and a review of the literature. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15(7): 569-572.
- Rossetti LC, Radic CP, Larripa IB, De Brasi CD. Developing a new generation of tests for genotyping hemophilia-causative rearrangements involving int22h and int1h hotspots in the factor VIII gene. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5): 830-836.

- Salviato R, Belvini D, Radossi P, Tagariello G. High resolution melting for F9 gene mutation analysis in patients with haemophilia B. *Blood Transfus* 2019; 17(1): 72-82.
- Shen BW, Spiegel PC, Chang CH, Huh JW, Lee JS, Kim J, Kim YH, Stoddard BL. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. *Blood* 2008; 111(3): 1240-1247.
- Shen W, Gu Y, Zhu R, Zhang L, Zhang J, Ying C. Copy number variations of the F8 gene are associated with venous thromboembolism. *Blood Cells Mol Dis* 2013; 50(4): 259-262.
- Simioni P, Cagnin S, Sartorello F, Sales G, Pagani L, Bulato C et al. Partial F8 gene duplication (factor VIII Padua) associated with high factor VIII levels and familial thrombophilia. *Blood* 2021; 137(17): 2383-2393.
- Simioni P, Tormene D, Tognin G, Gavasso S, Bulato C, Iacobelli NP, Finn JD, Spiezia L, Radu C, Arruda VR. X-linked thrombophilia with a mutant factor IX (factor IX Padua). *N Engl J Med* 2009; 361(17): 1671-1675.
- Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.
- Sun P, Ma L, Diao G, Li CQ, Lin FZ. Application of indirect linkage analysis and direct genotyping to hemophilia A carrier detection in Sichuan, China. *Genet Mol Res* 2015; 14(3): 8229-8235.
- van Galen KPM, d'Oiron R, James P, Abdul-Kadir R, Kouides PA, Kulkarni R et al. A new hemophilia carrier nomenclature to define hemophilia in women and girls: Communication from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2021; 19(8): 1883-1887.

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Resultados Inesperados em Amostra de Teste Individual
 - ✓ Resultados de CQI Fora da Faixa
 - ✓ Como Investigar Resultados Fora do Consenso em Pesquisas de Avaliação Externa de Qualidade
-

Resultados Inesperados em Amostra de Teste Individual: problemas relacionados aos testes de coagulação ocorrem em todos os laboratórios de coagulação, independentemente dos métodos, reagentes e equipamentos utilizados. Resultados inexatos podem ocorrer como consequência de problemas com uma amostra específica causados por problemas com a própria amostra. Isso pode ser decorrente do processo de coleta ou armazenamento inadequado da amostra antes da análise. Essas questões são discutidas na Parte 3 deste manual. Recomendações sobre o controle de variáveis pré-analíticas também estão disponíveis, especificamente relacionadas a hemofilia e distúrbios relacionados (Kitchen et al, 2020) e em relação à coleta (Kitchen et al, 2021a) e ao processamento (Kitchen et al, 2021b) de amostras em todos os aspectos dos testes laboratoriais de coagulação, e não são discutidas mais detalhadamente aqui. Problemas específicos podem ocorrer durante a análise de uma amostra relacionados ao reagente ou ao manuseio da amostra durante esse teste específico, apesar da análise bem-sucedida de amostras adjacentes imediatamente antes ou logo após a amostra com resultado questionável. Muitos analisadores usam uma sonda para aspirar amostras automaticamente e essas sondas às vezes descem até a detecção de um líquido e então aspiram um volume adequado de amostra de teste para concluir o teste. Se essa amostra de teste tiver bolhas na superfície, isso pode levar a uma coleta incorreta com volume inadequado gerando resultados falsamente anormais, como resultados de testes de triagem falsamente prolongados ou atividade falsamente baixa em ensaios calibrados. Pipetagem inexata de reagentes durante a análise também pode levar a resultados inexatos, por exemplo, se a sonda usada para movimentação de reagentes em um analisador estiver desalinhada. Isso provavelmente afetaria os resultados de várias amostras. Pode ser útil executar 10 réplicas da mesma amostra para avaliar a precisão dos resultados, que normalmente fica comprometida se ocorrer desalinhamento da sonda. As áreas de reagentes nos analisadores são geralmente mantidas em temperatura constante, frequentemente resfriadas abaixo da temperatura ambiente, mas com as misturas de reação aquecidas a 37°C durante a análise. A maioria dos resultados dos testes de coagulação é altamente dependente da temperatura; portanto, qualquer desvio fora de uma estreita faixa aceitável no resfriamento dos reagentes ou, em particular, no aquecimento das misturas de reação, pode causar resultados inexatos que de modo geral são falsamente anormais. Resultados falso-normais são muito mais raros do que resultados falso-anormais e são observados regularmente apenas em relação ao falso encurtamento do TTPA como consequência de problemas pré-analíticos, como hemólise in vitro. Coagulômetros totalmente automatizados frequentemente utilizam soluções de lavagem/limpeza que enxáguam as sondas entre sucessivas operações de pipetagem. Esse processo normalmente evita o carreamento de amostra ou reagente de um teste para a mistura de reação seguinte, mas eventos desse tipo já ocorreram. Por exemplo, carreamento parcial de amostra para uma mistura de reação de amostra seguinte ocorreu no passado em relação a componentes patológicos na amostra, como anticorpos antifosfolípidios ou paraproteínas, ou relacionado a fármacos terapêuticos, incluindo emicizumabe, o que pode causar falso encurtamento do TTPA na amostra seguinte. Componentes de reagentes, como o neutralizador de heparina em reagentes, foram transferidos para amostras subsequentes, o que poderia levar à perda da atividade da heparina se presentes na amostra subsequente. Os efeitos do carreamento de reagentes têm sido amplamente erradicados quando reagentes e instrumentos do mesmo fabricante são combinados. É mais provável que isso seja um problema se o reagente de um fabricante for usado no analisador de outro fabricante, se essa combinação não tiver sido validada para uso. É fundamental que os laboratórios sigam as orientações da empresa de diagnóstico sobre os intervalos permitidos entre as visitas de manutenção preventiva para minimizar os riscos de gerar resultados de amostras de pacientes que não podem ser liberados com segurança para decisões de manejo de pacientes. É importante que os laboratórios recebam informações clínicas/do paciente suficientes para que a

equipe experiente do laboratório possa identificar resultados de testes inesperados ou incomuns sempre que possível. Qualquer resultado de teste inesperado deve ser reanalisado para excluir a possibilidade de erro analítico. Quando o erro analítico for excluído como explicação para um resultado inesperado que não pareça se adequar ao quadro clínico do paciente, uma nova amostra deve ser obtida para confirmação do resultado.

Resultados de CQI Fora da Faixa: conforme descrito na Parte 2 deste manual, é conveniente manter um registro dos resultados de CQI para cada material de CQI na forma de gráfico. Muitos analisadores utilizam a abordagem de Levey-Jennings, como mostrado na Figura 23. Existem sistemas de CQI disponíveis para auxiliar os laboratórios na resolução de problemas, como as regras de Westgard (www.westgard.com) que utilizam 5 regras de controle diferentes. Elas apresentam poucos alarmes falsos e proporcionam confiança na detecção de erros. Por outro lado, os padrões de testes de CQI necessários para o uso eficaz desses sistemas não são adequados para o uso regular na maioria dos laboratórios de coagulação. As possíveis consequências clínicas de erros laboratoriais no manejo de pacientes com hemofilia e distúrbios relacionados significam que uma abordagem cautelosa para resultados de CQI fora da faixa é mais segura para os pacientes. Por esse motivo, qualquer CQI fora da faixa deve ser avaliado e, durante a investigação, os testes e o relato dos resultados dos pacientes devem ser suspensos. É útil identificar o caso de um CQI fora dos limites para ajudar a evitar atrasos futuros no processamento de amostras. Se o reteste do mesmo frasco de material de CQI gerar um resultado claramente dentro da faixa, pode haver um problema no analisador, que pode ser avaliado realizando 10 replicatas na mesma amostra de teste. Um problema no analisador é indicado se houver ampla variabilidade entre as replicatas. Muitas vezes, em testes de coagulação de rotina, um teste repetido no mesmo material fica novamente fora da faixa e a substituição do material por um novo frasco ou alíquota gera um resultado dentro da faixa, confirmando que o próprio material de CQI era a fonte do problema. Nesse caso, os resultados do paciente podem ser liberados com segurança. Se, por outro lado, o teste de um novo frasco/alíquota de CQI também gerar um resultado fora da faixa semelhante, há um problema com o sistema de teste que também afetaria os resultados do paciente. Nesse caso, os reagentes usados para o teste devem ser substituídos em sequência por um novo CQI após cada troca de um reagente. Quando um reagente de substituição leva a um resultado de CQI dentro da faixa, aquele reagente é identificado como a fonte do problema. Isso deve ser indicado nos registros de CQI para que padrões possam ser identificados e uma nova avaliação da estabilidade e do uso do reagente seja iniciada. Se a substituição de todos os reagentes relevantes ainda estiver associada a resultados fora da faixa, o analisador em questão deve ser retirado de uso até a análise pelo fabricante, e o laboratório deve mudar para um equipamento reserva, idealmente um coagulômetro alternativo que forneça os mesmos resultados ou, no caso de testes com pontos finais de coagulação, uma técnica manual (consulte a Parte 4 deste manual). Quaisquer resultados de pacientes obtidos desde o resultado de CQI dentro da faixa anterior devem ser revisados com testes repetidos para estabelecer em que ponto da sequência de teste da amostra o problema pode ter começado. Se os resultados de pacientes de amostras analisadas após o CQI dentro da faixa anterior tiverem sido liberados, o laboratório deve refazer o teste e recolher quaisquer resultados que não estejam em conformidade, além de revisar seus protocolos de testes de CQI, visto que testes de CQI adequados devem evitar a necessidade de recolha de quaisquer resultados de pacientes. A Figura 23 mostra o gráfico de Levey-Jennings dos resultados de CQI do TTPA. As linhas vermelhas pontilhadas mostram os limites superior e inferior da faixa aceitável para esse material. A primeira série de resultados está dentro da faixa, exceto um no limite inferior. A segunda seção mostra um aumento gradual e progressivo nos tempos de coagulação. Essa tendência ocorre se um componente do teste se modifica gradualmente ao longo do tempo. É improvável que isso ocorra em relação ao material de CQI liofilizado comercial armazenado de acordo com as instruções do fabricante, mas pode ocorrer se o material de CQI tiver sido preparado localmente, conforme descrito na Parte 2. Outras causas podem ser uma alteração gradual em um dos reagentes se não for armazenado adequadamente ou por deterioração gradual em algum aspecto do sistema de detecção de ponto final utilizado (por exemplo, deterioração da fonte de luz de um sistema foto-óptico). Esses tipos de problemas são raros com coagulômetros automatizados modernos.

CQI – Os resultados de TTPA mostram uma tendência

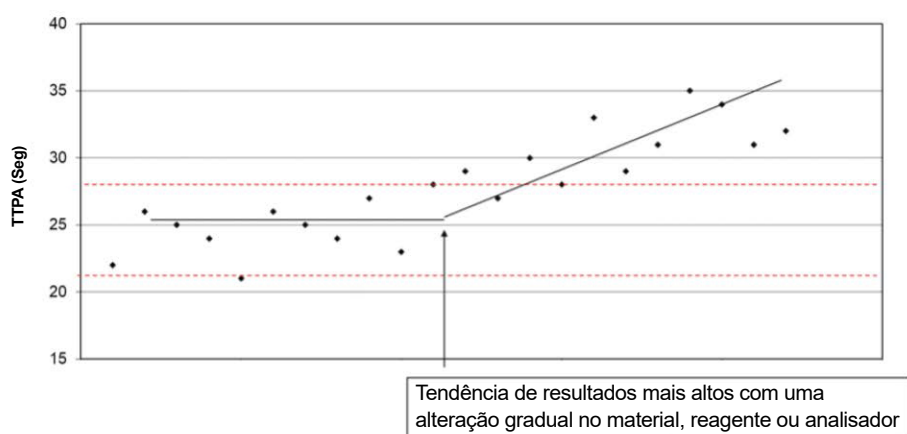


Gráfico de CQI de TTPA – amostra de CQI instável

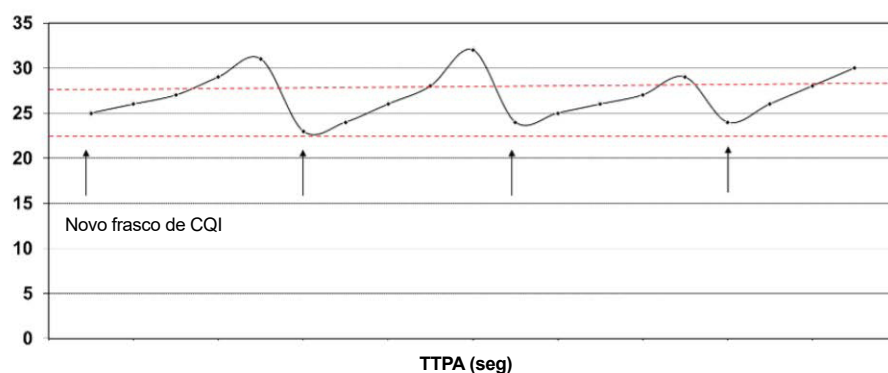


Figura 23. Gráfico de Levey-Jennings dos resultados de TTPA em material de CQI instável. As linhas vermelhas pontilhadas mostram os limites superior e inferior da faixa aceitável para esse material. Cada seta preta sólida indica quando um novo frasco de CQI foi carregado no analisador. Para cada novo frasco, há um aumento gradual no TTPA ao longo do tempo. Este exemplo ocorreu devido a um material de CQI congelado preparado localmente que se mostrou instável após o descongelamento. Em princípio, isso também pode ocorrer após a reconstituição de amostras liofilizadas se não forem preparadas adequadamente ou se a água utilizada para a reconstituição estiver contaminada.

Como Investigar Resultados Fora do Consenso em Pesquisas de Avaliação Externa de Qualidade: a participação em testes de proficiência ou EQA é um requisito essencial para que um laboratório garanta que resultados exatos sejam produzidos. Órgãos de acreditação que avaliam de acordo com as normas ISO, como a ISO 15189 (2022), exigem isso para quaisquer testes em que a EQA esteja disponível. Existe um IEQAS focado em hemofilia e distúrbios relacionados, supervisionado pela WFH (consulte a Parte 2 deste manual). Os resultados obtidos em exercícios de EQA podem ser usados para identificar questões importantes relacionadas à precisão e à exatidão dos testes laboratoriais de coagulação, desde que o material de teste no programa de EQA seja comutável com amostras de pacientes (ou seja, se comporte da mesma forma em um método específico que as amostras de pacientes se comportariam). A resolução eficaz de problemas com resultados de EQA que não estejam dentro do consenso de resultados de outros centros é importante para garantir o manejo seguro do paciente. Ao considerar resultados de EQA discrepantes, há uma série de fatores que devem ser levados em conta. Um resultado local fora do alvo derivado de resultados de outros centros é menos preocupante se a diferença não for grande o suficiente para impactar o manejo do paciente. Uma diferença clinicamente significativa é muito mais problemática do que uma diferença estatística que provavelmente não alteraria o diagnóstico ou o manejo de um paciente.

Um único resultado que seja acentuadamente diferente da média ou mediana dos resultados de outros centros, a ponto de afetar o manejo do paciente se a amostra fosse de um paciente do laboratório, deve ser investigado mais a fundo. Isso pode incluir o seguinte:

- i) Verificar se a amostra foi armazenada corretamente no recebimento, reconstituída corretamente e se o teste foi realizado de acordo com o procedimento escrito para esse método. Se o problema foi considerado restrito à análise da amostra de EQA, os resultados do paciente não seriam afetados.
- ii) Verificar se o CQ interno no momento da realização do teste de EQA era satisfatório. Caso contrário, é provável que tenha havido um problema com o teste que pode ter afetado os resultados do paciente, e os resultados do paciente devem ser revisados.
- iii) Consideração dos detalhes específicos da amostra de teste. Se anormais, os resultados obtidos podem ser consequência do defeito específico na amostra de EQA.

Quando um laboratório apresenta resultados discrepantes em pesquisas consecutivas que ocorrem ao longo de uma série de pesquisas, é necessária uma investigação que deve levar em conta o padrão na relação entre os resultados locais e a média ou mediana dos resultados de outros centros que utilizam metodologia semelhante. Além das investigações após um único resultado discrepante mencionadas acima, o seguinte deve ser considerado:

- i) O impacto clínico dos resultados deve ser avaliado. É possível que, no caso de um ensaio com precisão muito boa, um laboratório possa estar persistentemente fora do consenso, mas ainda assim registrar resultados relativamente próximos do alvo, sem consequências clínicas. Também é possível que, se for utilizada uma faixa de referência determinada localmente, qualquer viés nos resultados do paciente seja compensado por uma faixa de referência apropriada.
- ii) Resultados consistentemente altos ou consistentemente baixos em comparação com a média ou mediana de outros centros geralmente estão relacionados à calibração. Normalmente, laboratórios com esses problemas possuem uma curva de calibração estabelecida em algum momento no passado que não é apropriada para os testes atuais, seja devido a uma alteração no número de lote de um componente do ensaio ou porque a variabilidade diária nos resultados dos testes exige nova calibração juntamente com a análise das amostras de teste. A recalibração geralmente resolve esse problema em centros que utilizam uma curva de calibração histórica. A possibilidade de uma potência inadequada ter sido atribuída ao calibrador, embora rara, deve ser considerada. Ao investigar a possibilidade de um problema relacionado à calibração, pode ser útil analisar uma amostra com um valor atribuído independentemente como amostra de teste para verificar o quanto os resultados das amostras de teste estão sendo superestimados ou subestimados. Esse material também pode ser usado para realizar uma nova calibração. O programa IEQAS da WFH tem permissão para fornecer um frasco do padrão de plasma do SSC da ISTH para esse tipo de investigação de resolução de problemas. Ele possui valores atribuídos para diversos parâmetros de coagulação. O efeito de uma nova calibração pode ser avaliado analisando um pequeno grupo de amostras de teste antes e depois da nova calibração. O padrão de plasma do SSC não está disponível para uso rotineiro na calibração de métodos de ensaio locais.
- iii) Resultados acima da média ou mediana em algumas pesquisas e abaixo da média ou mediana em outras sugerem imprecisão do ensaio. Isso pode ocorrer como consequência de instrumentos mal conservados, manuseio inadequado dos reagentes (ou seja, reconstituição ou armazenamento), instabilidade dos reagentes ou problemas relacionados ao treinamento ou à competência da equipe.

Sempre que possível, a análise de amostras repetidas após a conclusão da investigação e após a implementação de quaisquer melhorias necessárias é útil para confirmar o sucesso ou fracasso das intervenções. A revisão retrospectiva dos resultados de pesquisas de EQA anteriores, antes da ocorrência do problema de resultados discrepantes, deve ser realizada juntamente com os registros laboratoriais de alterações de lote, calibrações, manutenção de instrumentos e alterações na metodologia, para avaliar se a alteração no desempenho corresponde a quaisquer alterações internas relevantes. A análise de dados de EQA e os relatórios de desempenho são, por natureza,

retrospectivos, visto que a análise e o relato normalmente ocorrem algum tempo após a realização dos testes no laboratório. Portanto, qualquer problema identificado pode ter afetado os resultados dos pacientes no mesmo período. O laboratório deve revisar com os médicos os resultados anteriores dos pacientes em relação a quaisquer testes em que a EQA indique a possível presença de inexatidão clinicamente relevante. A revisão deve considerar se o diagnóstico ou o manejo de algum paciente pode ter sido afetado negativamente. Novos testes podem ser necessários se o padrão de resultados discrepantes puder ter afetado negativamente os pacientes.

Referências

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

Srivastava A, Santagostino E, Dougall A, Kitchen S, Sutherland M, Pipe SW et al. WFH guidelines for the management of hemophilia, 3rd edition. *Haemophilia* 2020; 26 Suppl 6: 1-158.

1184 rue Sainte-Catherine Ouest
Bureau 500
Montreal, Quebec H3B 1K1 Canada
Tel.: (514) 875-7944
Fax: (514) 875-8916
E-mail: wfh@wfh.org

www.wfh.org

