

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 FVW, 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:

- 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.
- Calibrador 1 de VWF:Ag: contém solução salina com conservantes.
- 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-FVIII 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 FVIII. 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, imunodetecção 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).

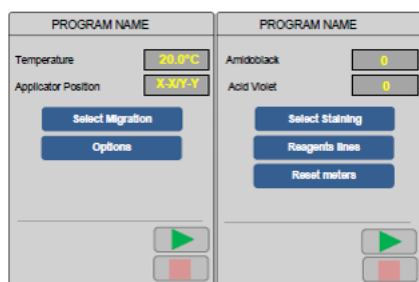


Figura 10. Analisador Hydrasys

- 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.

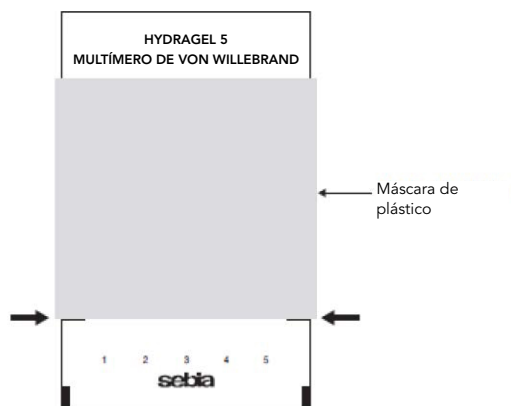


Figura 12. Analisador Hydrasys

- 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)

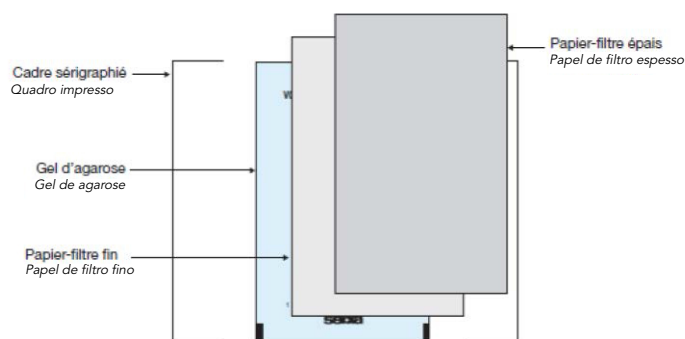


Figura 13. Analisador Hydrasys

- 28) Aplique um papel de filtro fino e um papel de filtro grosso (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 grosso 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 grosso, 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) Hydragel 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.

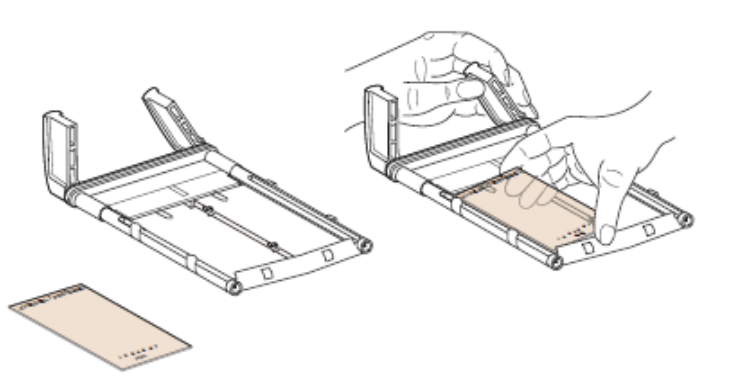


Figura 14. Analisador Hydrasys

- 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".

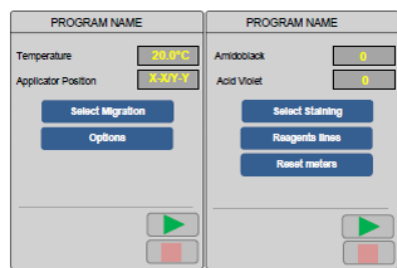


Figura 15. Analisador Hydrasys

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:

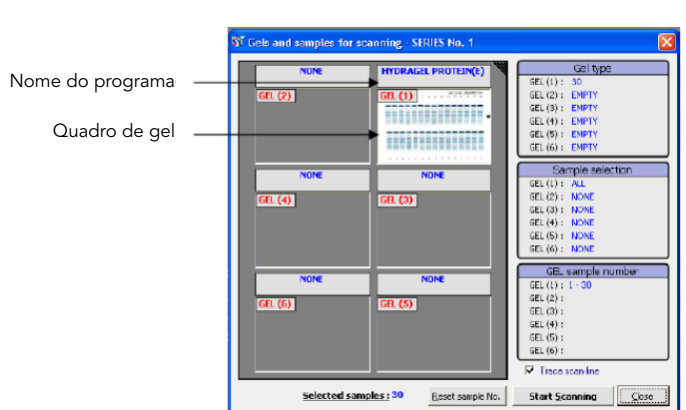


Figura 16. Analisador Hydrasys

- 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:

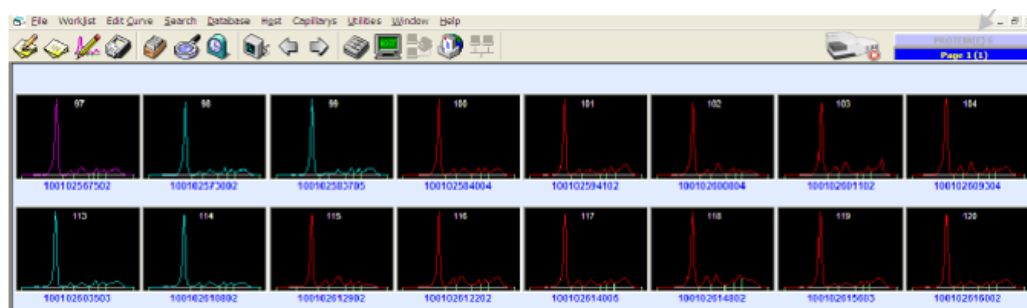


Figura 17. Analisador Hydrasys

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.

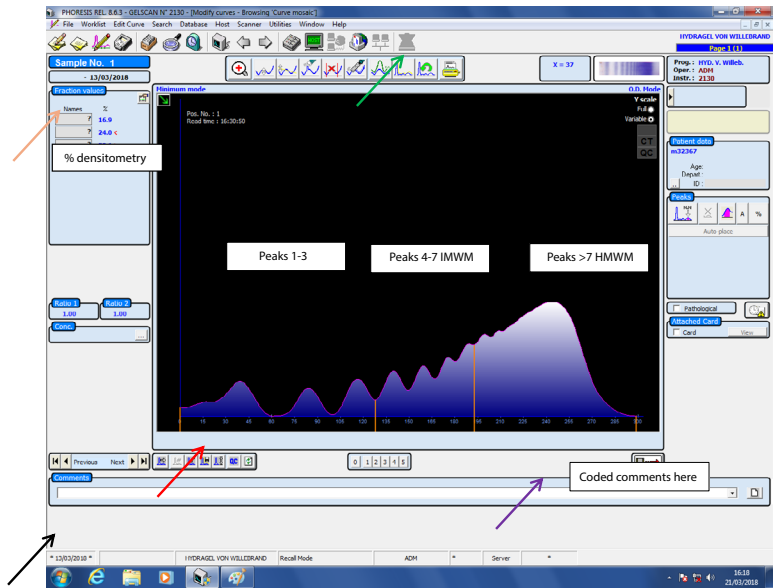


Figura 18. Analisador Hydrasys

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 HMW 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:FVIII)	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: FVIII/Ag reduzida (<0,7)	normal	normal	normal	normal	Fenótipo semelhante a hemofilia A leve/moderada ou portador, confirmado com ensaio de VWF:FVIII 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.

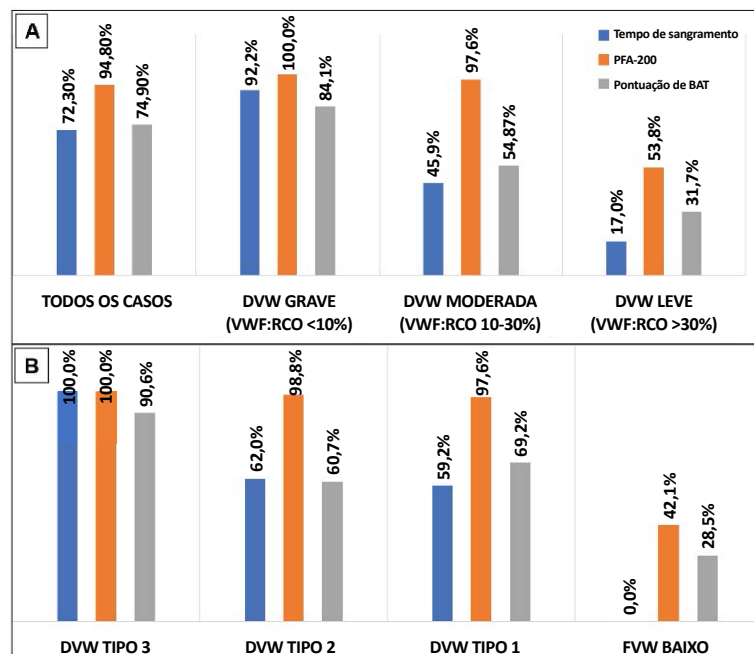


Figura 19. Sensibilidade geral do SBT e do PFA-200

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* (NIH) [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.