

# DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE TROMBOFILIA

---

**Serviço de Patologia Clínica**  
Laboratório de Hematologia

Lúcia Coimbra  
4 de Abril de 2019

# Resumo

- Mecanismos da coagulação
- Testes de coagulação
- Importância da fase pré analítica
- Trombofilias Hereditárias
- Trombofilias Adquiridas
- Guidelines – quando e quem testar?
- Marcha diagnóstica
- Realidade do HFF

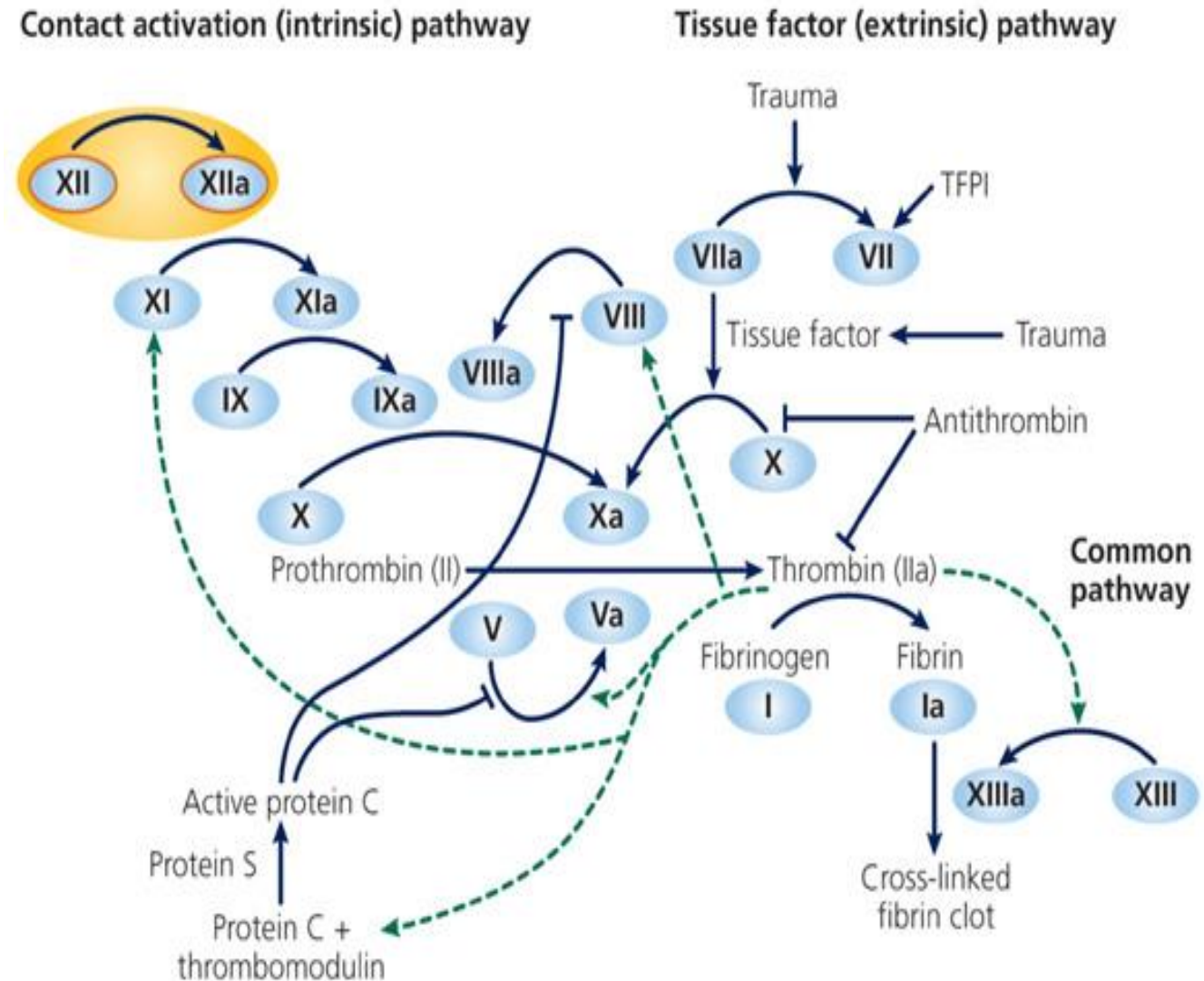
# Mecanismo da Coagulação

- Três fases fundamentais:
  - Adesão, ativação e agregação plaquetária
  - Cascata de coagulação
  - Fibrinólise

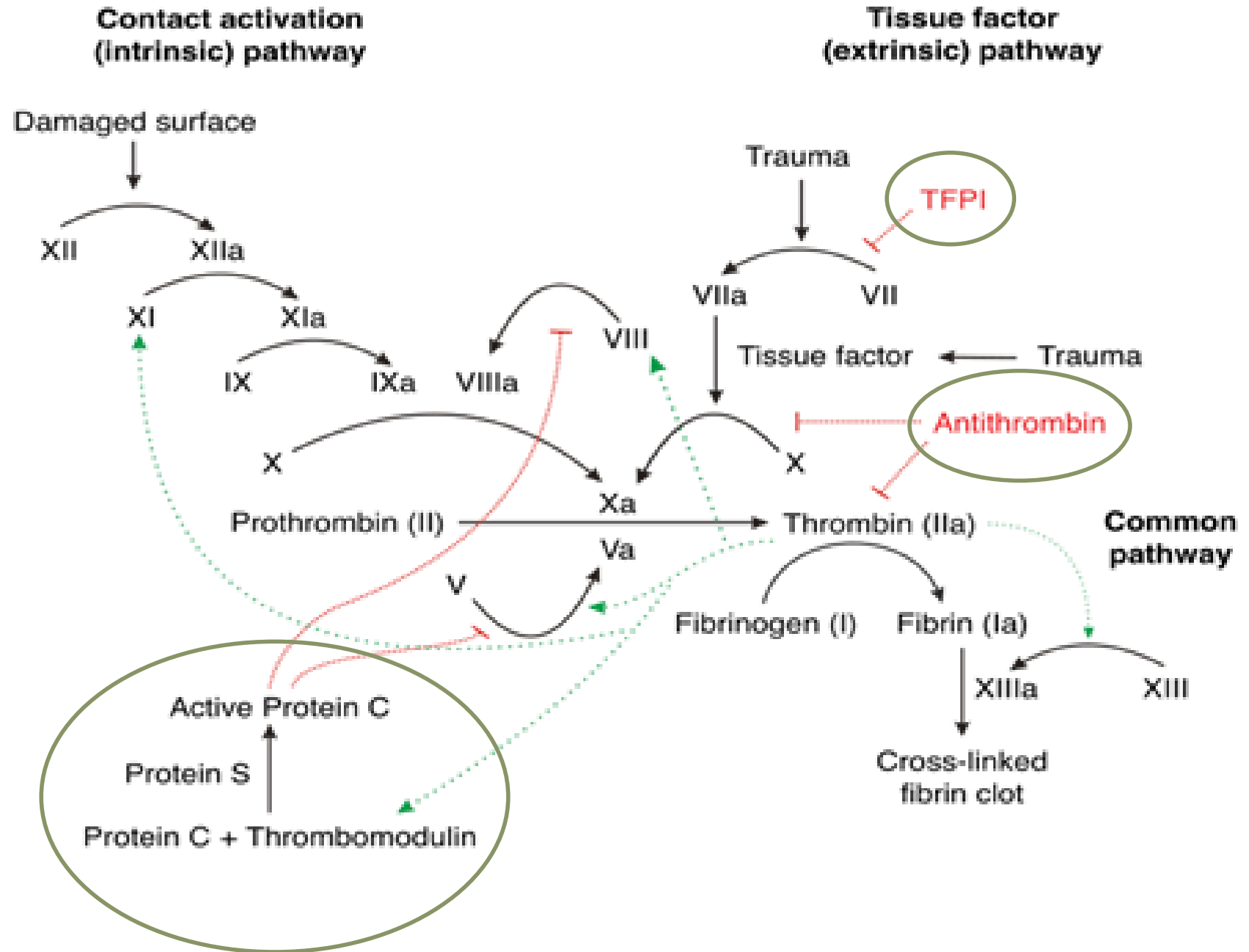


# Mecanismo da Coagulação

- Cascata de coagulação:
  - Série de reações enzimáticas que ocorrem sobre uma superfície fosfolipídica (membrana de célula ativada)
  - Ativação por duas vias:
    - Intrínseca
    - Extrínseca
  - Evento central é geração de trombina
  - Inclui inibidores fisiológicos da coagulação



# Anticoagulantes Naturais



# Testes de Coagulação:

## Testes de rastreio

- Tempo de Protrombina (TP)
  - INR (deve ser utilizado apenas em doentes anticoagulados com AVK)
- Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT)
- Fibrinogénio
- D-Dímeros?
  - Sensível à presença de trombose
  - Inespecífico
  - Funciona apenas para exclusão de trombose
  - Não indica gravidade ou local de trombose
  - Não distingue entre evento agudo ou crónico
  - Possibilidade de utilização na monitorização após suspensão de anticoagulação (indicador de trombose recorrente)

# Testes de Coagulação:

## Testes específicos

- Testes de mistura
- Doseamento de fatores
- Doseamento de inibidores
- Tempo trombina (TT)
- Tempo de Reptilase (TR)
- dRVVT (Tempo veneno víbora de Russel)
- Anti Xa
- Pesquisa de mutações (PCR)
- Pesquisa de anticorpos (quimioluminescência)

# Testes de Coagulação:

## Fase pré analítica

### Antes da colheita:

- Prescrição racional de testes
  - Painel hemorrágico
  - Painel trombótico
- Testes em fase aguda vs testes em ambulatório
  - Doentes internados!
- Informação de medicação instituída
  - Suspende anticoagulação!





# Testes de Coagulação:

## Fase pré analítica

Anticoagulant	PT	APTT	Fib	TT	DDimer
Warfarin	+++	+			Low
Unfractionated heparin	+	+++		+++	Low
LMWH		+			Low
Dabigatran	+	++	-/+	+++	Low
Rivaroxaban	++	+			Low
Apixaban	-/+	-/+			Low

# Testes de Coagulação:

## Fase pré analítica

### Quando suspender anticoagulação?

- Antagonistas de vitamina K – 15 dias
- Anticoagulantes orais diretos – 48 horas
- Heparina – 24H

No caso de risco trombótico muito elevado manter heparina de baixo peso molecular

# Importância da Colheita

- Não traumática
- Evitar contaminação com heparina
- Encher corretamente o tubo (pelo traço)
  - Proporção de citrato para sangue total - 1:9
- No caso de Htc > 55% adaptar dose de citrato
  - Proporção de citrato para plasma – 1:5
- Não misturar sangue de dois tubos mal cheios
- Agitação suave do tubo para misturar

# Transporte e processamento da amostra:

## Coagulação de rotina

- Transporte em temperatura ambiente, para o Laboratório o mais depressa possível
  - Fator VII ativado pelo frio
  - Precipitação ao frio do FVIII e FvW
- Centrifugação a 1500g durante 15min
- Processamento de amostras
  - Estudo plaquetário – até 2H após colheita
  - Restantes provas – até 4H após colheita

# Transporte e processamento da amostra:

## Coagulação especial

- 2ª centrifugação (plasma) para eliminação de resíduo plaquetário
- Armazenamento do plasma a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 2 a 4 semanas
  - Descongelamento em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 3-5 min e homogeneizar
- Hemólise, Lipémia e Ictericia – Não processar!

# Trombofilia – *Momentum* diagnóstico

- As amostras devem ser colhidas pelo menos 30 a 45 dias após o último evento trombótico.
- Não colher amostras nas seguintes situações:
  - Episódio agudo de TEV;
  - Durante terapêutica anticoagulante oral com antagonistas da vitamina K;
  - Durante terapêutica com heparina;
  - Mulheres grávidas e até 3 meses após o parto;
  - Durante terapêutica com estrogénios – esperar pelo menos 2 meses após a suspensão;
  - Doentes com síndrome nefrótico, disfunção hepática, CID, doença inflamatória.

# Trombofilia – *Momentum* diagnóstico

Testes de pesquisa de trombofilia:

- Não definem um quadro clínico de trombose nem ajudam a fazer o diagnóstico diferencial
- Não determinam as medidas terapêuticas imediatas

**NÃO SÃO  
ANÁLISES  
URGENTES!!**

# Trombofilia

Alterações hereditárias ou adquiridas do sistema de **coagulação** que levam a um estado pró-trombótico

- Hereditária (congénita ou juvenil) - geneticamente determinada
- Adquirida - determinada por factores adquiridos ao longo da vida



# Trombofilia – Classificação

Hereditária/Congénita	Adquirida
Associada a hx. familiar de TEV	Não associada a hx. familiar
TEV recorrente	História de imobilização/cirurgia recente
Não associada a factores desencadeantes	Terapêutica com estrogénios
<50 anos de idade	Associada a outras patologias

---

# Trombofilia - Classificação

## Hereditária:

- Défice de Antitrombina
- Défice de Proteína C
- Défice de Proteína S
- Fator V de Leiden
- Mutação PT G 20210 A (Protrombina)
- Mutação MTHFR (Hiperhomocisteinémia)
- Disfibrinogenémia
- Aumento do PAI

## Adquirida:

- Síndrome Antifosfolipídico
- Aumento de Fatores de coagulação (FVIII)
- Neoplasias sólidas
- Gravidez
- Neoplasias Mieloproliferativas
- Obesidade
- Imobilização
- Traumatismo
- Cirurgia *major* e ortopédica
- Cateter Venoso Central

# Trombofilia hereditária – risco trombótico

- **Trombofilia *major***

Defice de Antitrombina - 1.8% ao ano

Defice de Proteína C - 1.5% ao ano

Defice de Proteína S- 1.9% ao ano

- **Trombofilia *minor***

Presença de Fator V Leiden - 0.5% ao ano

Presença de mutação do gene da protrombina - 0.3% ao ano

Aumento do Factor VIII - 0.5% ao ano

- **Trombofilia muito baixo risco**

Aumento do Fator IX - 0.1% ao ano

Aumento do Fator XI - 0.2% ao ano

Taxa anual de recorrência de trombose venosa

Trombofilia	Recorrência de trombose venosa
Deficiência de antitrombina	9,3% (1,9-27,1)
Deficiência de proteína C	6,9% (2,8-14,3)
Deficiência de proteína S	8,9% (2,9-20,9)
Factor V Leiden	3,6% (1,7-6,9)

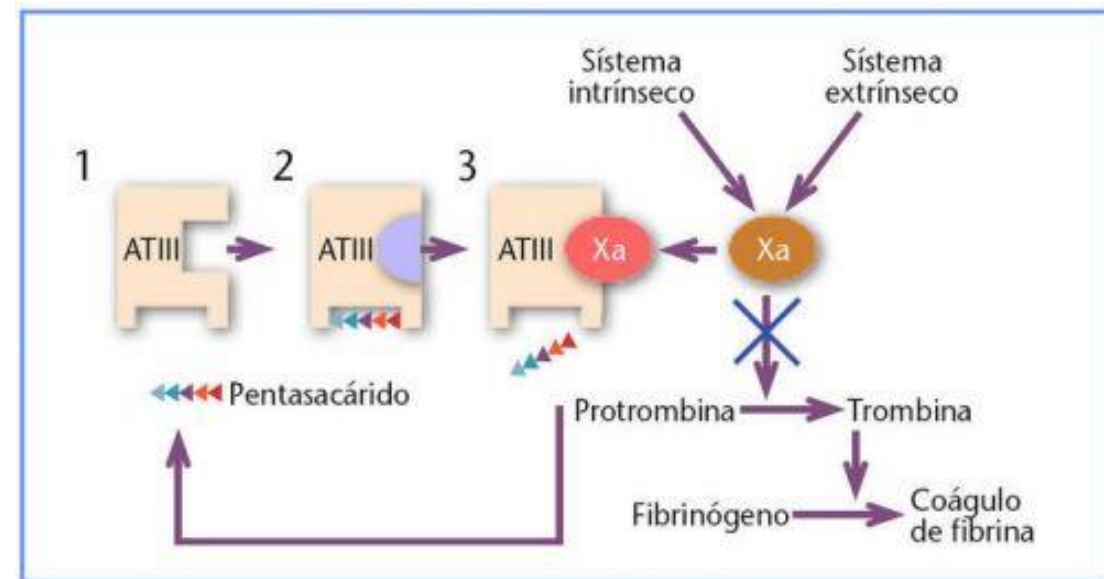
# Trombofilia hereditária - prevalência

## *Prevalência de trombofilia hereditária<sup>1</sup>*

<b>Trombofilia</b>	<b>População geral</b>	<b>Doentes com TEV</b>
Deficiência de antitrombina	0,02%	7%
Deficiência de proteína C	0,2%	7%
Deficiência de proteína S	0,03-0,13%	7%
Factor V Leiden*	4-7%	21%
Mutação do gene da protrombina*	0,7-4%	6%
Níveis elevados de factor VIII	11%	25%

# Antitrombina (AT)

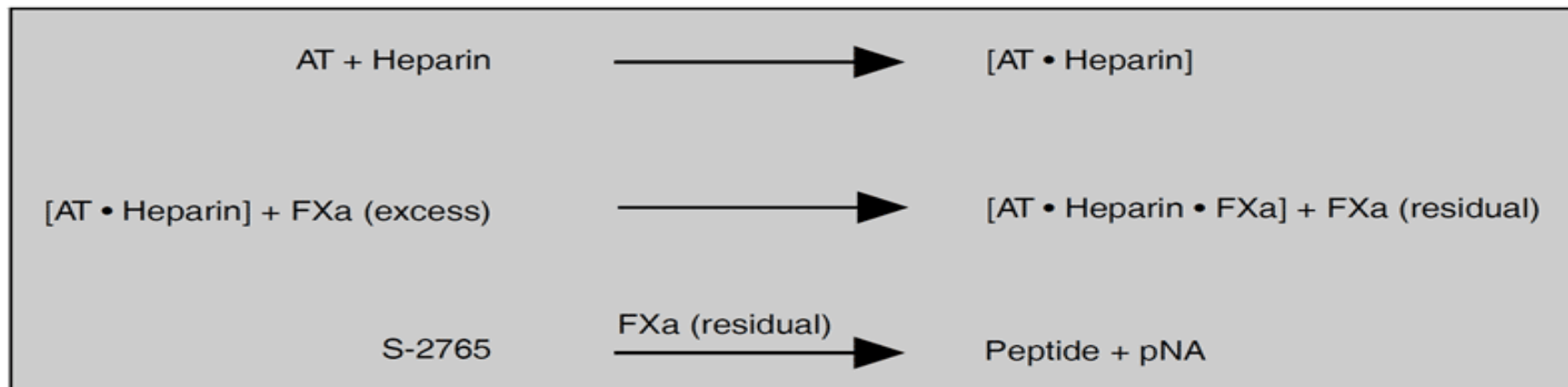
- Inibidor primário da trombina
- Efeito inibitório sob FIXa, FXa e FXIa
- Acelera a dissociação do complexo FVIIa/FT e impede a sua reassociação
- Elimina qualquer atividade procoagulante excessiva ou indesejável



# Défice de Antitrombina

## Teste cromogénico (funcional)

- Baseado no princípio da inibição pela AT do FIIa (protrombina) ou FXa, na presença de heparina
- Heparina potencia a ação da AT para inibir o FXa ou o FIIa
- Medição da quantidade de FXa ou FIIa residual o qual é inversamente proporcional à quantidade de AT da amostra



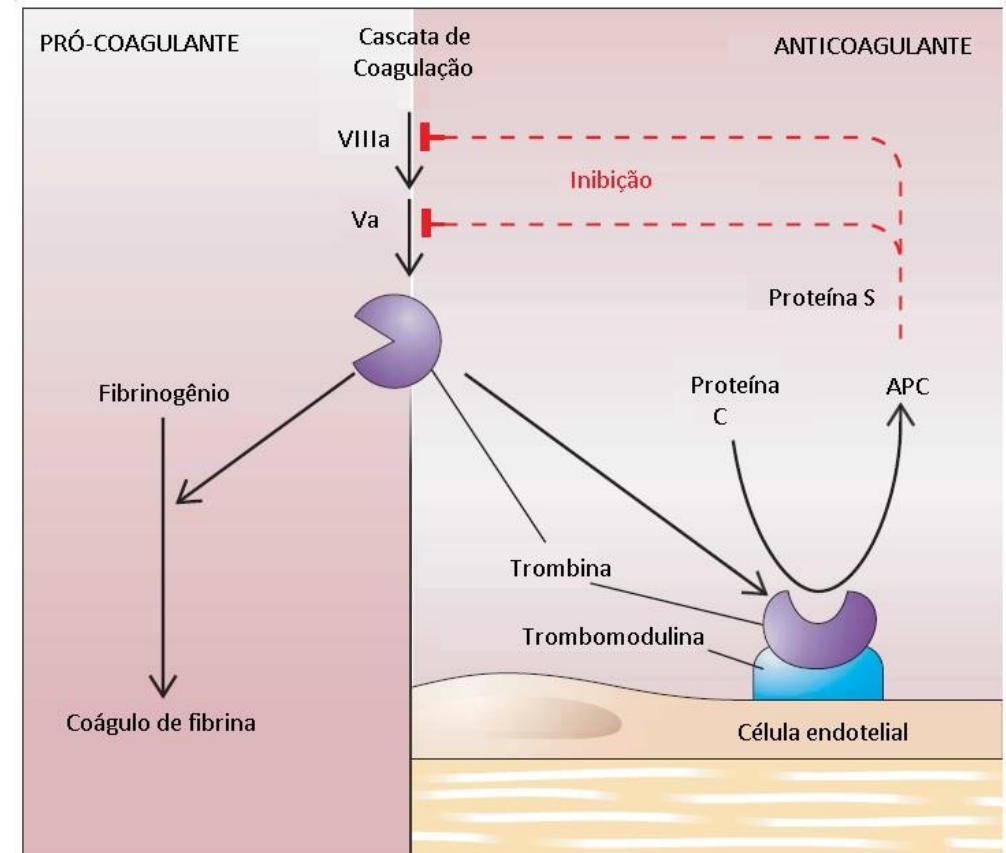
# Défice de Antitrombina

## Causas de deficiências adquiridas de AT

- Tratamento com heparina
- Coagulação Intravascular Disseminada (CID)
- Pre-eclampsia
- Doença hepática
- Síndrome nefrótico
- Cirurgia major
- Neoplasias
- Leucemia promielocítica aguda (LPA)
- Tratamento com asparaginase

# Proteína C e S

- Proteína C inibe a coagulação clivando e inativando os FVa e FVIII
- Proteína S atua como cofator não enzimático nas reações de inativação





# Défice de Proteína C e S

## Teste coagulométrico

- Baseado num TP ou num aPTT
- Determinação do aPTT no plasma do doente, com activador da Proteína C (PC)
- A PC activada vai inibir o FVa e o FVIII tornando mais lenta a formação do coágulo
- Quando há défice da PC o coágulo forma-se mais rapidamente
- Para doseamento de Proteína S acrescenta-se excesso de PC
  - Limitações deste método:
    - Menos específico que ensaio cromogénico
    - Interferência dos aPL e heparina
    - Interferência FV de Leiden ou outros fatores de coagulação

# Défice de Proteína C

## Teste cromogénico

- Baseado no princípio da activação da PC da amostra por um activador
- Após incubação junta-se um substrato cromogénico
- A quantidade de proteína C é directamente proporcional à densidade óptica.

Neste teste não há nenhuma reação de coagulação.

1. Protein C<sub>(Sample)</sub> + Protac® → APC
2. APC + chromogenic substrate → pNA (yellow) + peptide

# Défice de Proteína C

## Deficiências adquiridas de Proteína C

- Infecção grave (meningite meningocócica)
- Anticoagulação com AVK
- Def. Vitamina K
- Doença hepática
- CID
- Transplante hematopoiético
- Tratamento com asparginase

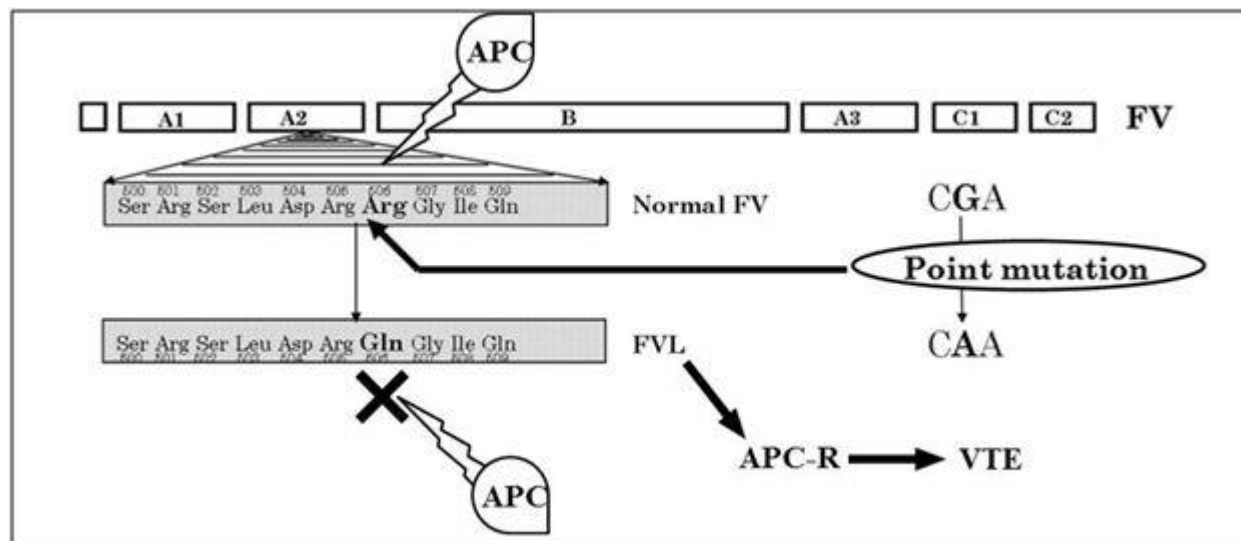
# Défice de Proteína S

## Deficiências adquiridas de Proteína S

- Gravidez
- Puerpério
- Anticontraçetivos orais
- Anticoagulação com Antagonistas da Vitamina K
- Def. Vitamina K
- Doença hepática
- CID
- Sind. Nefrótico
- aPL

# Factor V de Leiden

**Factor V Leiden** é uma mutação (gene do FV) que impossibilita a atuação da Proteína C activada.



Polimorfismo no Fator V (mutação "Factor V- Leiden", 1691G/A)

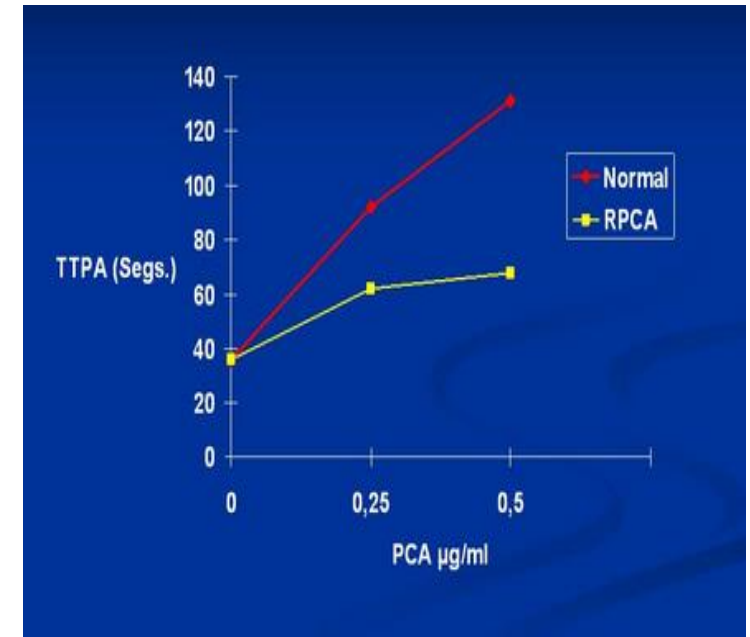
# Resistência á Proteína C ativada (aPCR)

- Em condições normais, a Proteína C activada (PCa), como inibidor da coagulação, vai inativar o FVa e o FVIIIa, prolongando o tempo de coagulação
- Na resistência do plasma à PCa este efeito de inativação está ausente ou diminuído
- A Resistência à PCa em alguns testes coagulométricos pode dever-se a outras causas, por exemplo FVIII ou FII elevados, portadores do polimorfismo da protrombina ou anticoagulante tipo lupus

# Resistência à Proteína C ativada

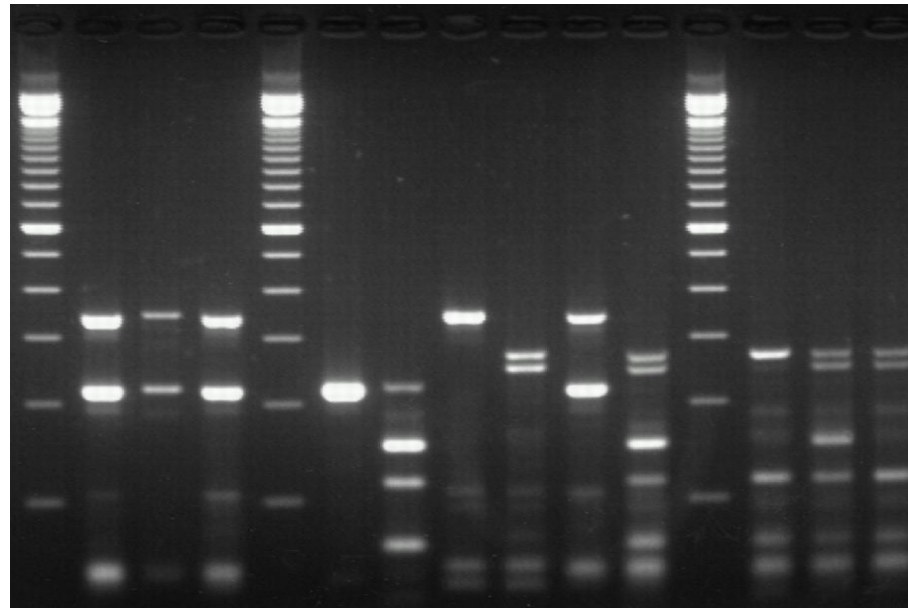
## Métodos:

- 1ª geração
  - aPTT com e sem PCa adicionada
  - Calculo da razão entre estes dois testes
    - Exemplo  $75s/35s = 2.14$
  - Razão baixa em portadores de Resistência à PCa
  - Razão alta com FV normal
    - Os valores da razão dependem dos instrumentos e dos reagentes
    - Não muito específico, são possíveis múltiplas interferências
    - Grande influência do circuito pré analítico (ex. Colheita)
- 2ª geração
  - Com uma pré-diluição com plasma deficiente em FV (100% específico e sensível)



# Mutação da protrombina

- Análise de mutação pontual por reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)
- Correlaciona-se com níveis mais altos de protrombina (FII) no sangue mas para fazer a pesquisa é **obrigatório fazer o estudo genético.**





# Trombofilia adquirida – Sind. Antifosfolipídico

Doença auto-imune caracterizada pela produção de anticorpos dirigidos à camada fosfolipídica, que determina um estado pró-trombótico.

- Associado a trombose arterial e venosa
- Doentes com anticoagulante lúpico têm um aumento do risco de TEV recorrente em 40%
- Dificuldade na avaliação:
  - nem todos os anticorpos antifosfolípidicos conferem o mesmo risco de trombose
  - até 5% da população em geral é portadora destes AC, sem eventos

# Trombofilia adquirida – Sind. Antifosfolipídico

## Crítérios Clínicos:

- Um ou mais episódios de trombose venosa ou arterial em qualquer localização, na ausência de vasculite
- Morte intrauterina não explicável (feto sem malformações) após as 10 semanas de gestação
- Parto antes das 34 semanas resultante de pré-eclampsia ou insuficiência placentar
- Três ou mais abortos espontâneos, consecutivos, antes das 10 semanas de gestação (não relacionados com alterações genéticas ou anatómicas)

# Trombofilia adquirida – Sind. Antifosfolipídico

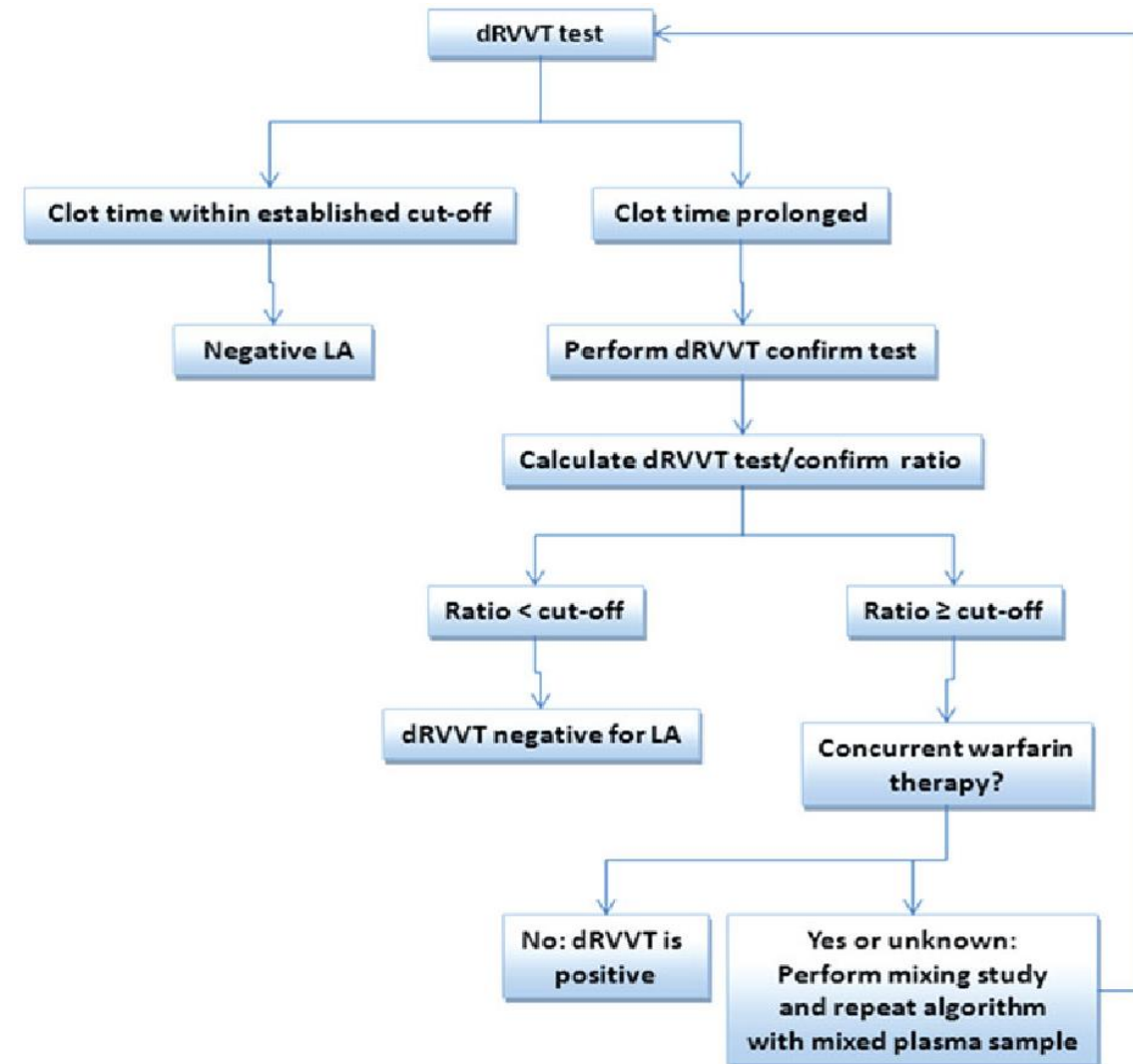
## Critérios Laboratoriais:

- Anticoagulante lúpico no plasma:
  - 2 ou mais ocasiões, 12 semanas entre determinações.
- Anticorpo anti-Cardiolipina (aCL) (IgG e/ou IgM) no soro ou no plasma:
  - Título  $\geq$  40 GPL ou MPL U/mL
  - 2 ou mais ocasiões, 12 semanas entre determinações.
- Anticorpo anti- $\beta$ 2GPI (IgG e/ou IgM), no soro ou plasma:
  - Título  $\geq$  10 RU/mL
  - 2 ou mais ocasiões, 12 semanas entre determinações

# Trombofilia adquirida – Sind. Antifosfolipídico

## Anticoagulante lúpico

- dRVVT *screening*
- dRVVT confirmatório
- Razão s/c > 1,2
- Testes de Mistura (1:1)
  - Não correcção positivo para presença de inibidor



# Guidelines – quando e quem testar?

- Trombofilia Hereditária:
  - Evento trombótico venoso não provocado antes dos 50 anos
  - História familiar pesada de trombose venosa não provocada
  - Recém-nascidos com purpura fulminans devem ser imediatamente testados para defice de proteina C e S
  - Grávidas com familiar direto com história de trombose venosa não provocada na gravidez
  - Trombose venosa de locais incomuns (veias cerebrais ou esplenicas)
- Trombofilia adquirida:
  - Trombose após os 40 anos, sem fator precipitante evidente
  - Abortos de repetição
  - Síndrome de HELLP

# Trombofilia – marcha diagnóstica

## Avaliação inicial

- Anamnese: **histórias pessoal e familiar de TEV** (tromboses em idade jovem, recorrentes, em localizações incomuns, abortos de repetição)
- **Factores de risco adquiridos** (reversíveis)
- Exame objetivo
- ECD: hemograma, para **exclusão de Neoplasias Mieloproliferativas**

**EQUACIONAR** hipótese de **Neoplasia oculta**. A investigação invasiva **NÃO** está indicada por rotina.

# Trombofilia – marcha diagnóstica

## Avaliação Laboratorial

TP – detecta efeito dos anticoagulantes orais, que causam ↓ níveis das proteínas C e S

aPTT – possível identificação da SAAF (dependendo da sensibilidade), não é suficiente para excluí-lo

TT – identificação da disfibrinogenémia e contaminação por heparina;

# Trombofilia – marcha diagnóstica

## Avaliação laboratorial

Quando clinicamente indicada, a avaliação laboratorial deverá incluir os seguintes testes:

- ✓ Deficiência de AT
- ✓ Deficiência Prot. C
- ✓ Deficiência Prot. S
- ✓ Mutação FV *Leiden*
- ✓ Mutação G20210A da Protrombina
- ✓ aPL – anticoagulante lúpico, anticardiolipina, anti-  $\beta_2$  glicoproteína I



# Trombofilia – marcha diagnóstica

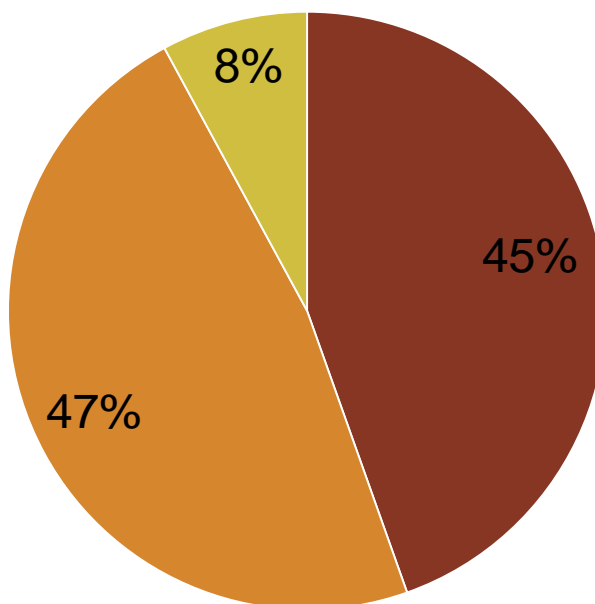
## Avaliação laboratorial

- A supervisão da escolha dos testes e a sua interpretação deve ser realizada por especialistas experientes
  - conhecedores dos factores relevantes que podem influenciar os resultados, em cada caso individual
- O objetivo do laboratório é evitar resultados falsos negativos e positivos (mais comuns)

# Realidade do HFF

## Pedidos Antitrombina em 2018

■ Ambulatório ■ Internamento ■ Urgentes

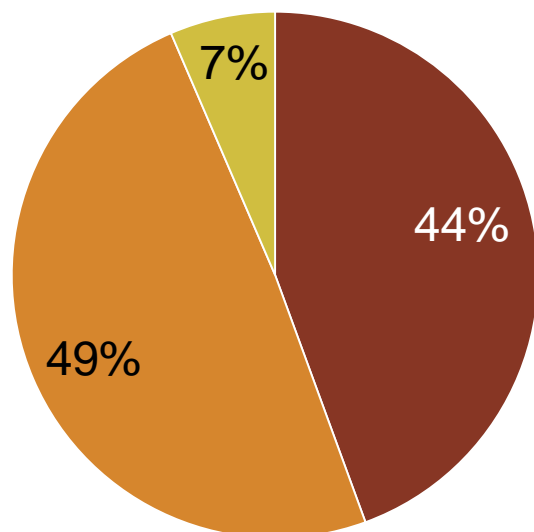


Nº total de pedidos - 442

# Realidade do HFF

## Pedidos Proteína C em 2018

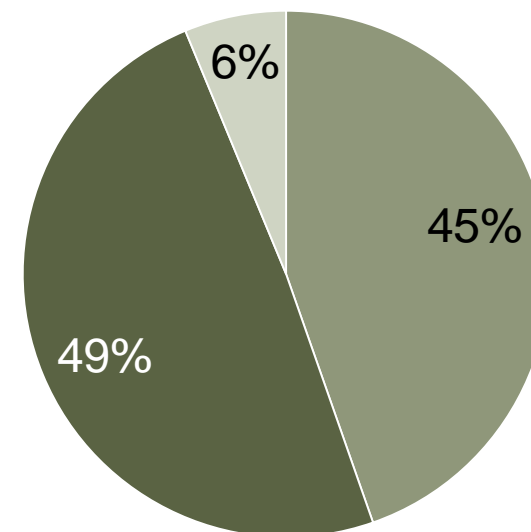
■ Ambulatório ■ Internamento ■ Urgentes



Nº total de pedidos - 448

## Pedidos Proteína S em 2018

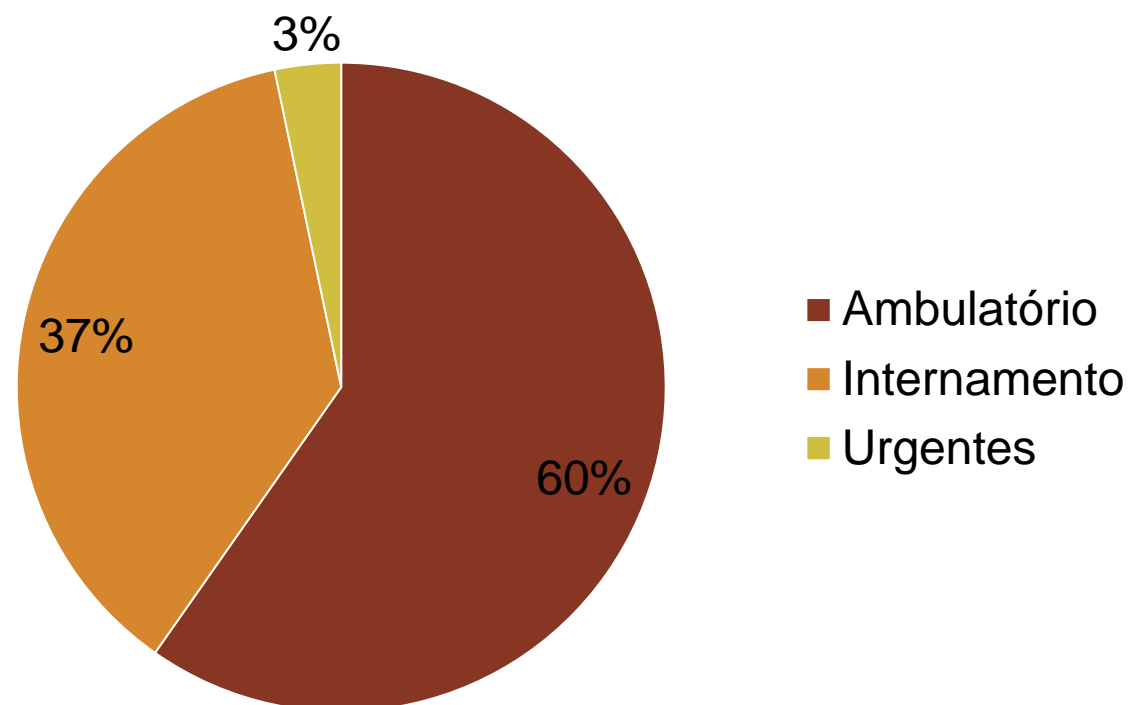
■ Ambulatório ■ Internamento ■ Urgentes



Nº total de pedidos - 448

# Realidade do HFF

## Pedidos Ac. Lúpico em 2018



Nº total de pedidos - 879

# Conclusão

- O correto diagnóstico laboratorial de trombofilia depende de uma boa comunicação entre o laboratório e as áreas clínicas
- Os pedidos de análises devem ser racionais e adaptados à história clínica e à terapêutica atual do doente
- Apesar das múltiplas interferências existentes nos testes disponíveis, um timing correto na sua realização aumenta a sensibilidade e especificidade para perto dos 100%
- Existe uma consulta de Coagulação, da responsabilidade do serviço de Imunohemoterapia e da Medicina 4, para o estudo de trombofilia

Obrigada