



GUIA TÉCNICO



COAGULAÇÃO

Edição: 28/09/2010 • Última Revisão 25/11/2016



Labtest 

INTRODUÇÃO

HEMOSTASIA

É o processo pelo qual o sangue permanece líquido vascular, apesar das lesões que venham a sofrer. A fluidez do sangue depende da:

- Integridade do endotélio,
- Velocidade do fluxo sanguíneo,
- Presença de heparina, anticoagulante natural, produzido pelos mastócitos.

Os três mecanismos envolvidos na hemostasia são:

- Resposta Vascular;
- Atividade plaquetária;
- Coagulação do sangue.

Sabe-se que a função básica da circulação é nutrir os tecidos. Então, para que os nutrientes, gases, hormônios, catabólitos e anticorpos sejam distribuídos ou removidos dos tecidos é necessário que o sangue possa fluir dentro de um vaso sanguíneo qualquer. Assim, a fluidez sanguínea deve ser mantida e garantida, de modo que se evite o extravasamento de sangue e também a deposição intravascular de células e substâncias formando um coágulo chamado **trombo**. O extravasamento de sangue é o que origina as hemorragias e a formação de trombos pode ocluir um vaso. Com isso, o tecido que se encontra depois do local ocluído vai sofrer falta de oxigênio, ocorrendo necrose que nada mais é do que um infarto.

Então, quando o sangue escapa do interior dos vasos perde a fluidez, torna-se viscoso e em pouco tempo forma um coágulo que, posteriormente se retrai, organiza ou dissolve. Este é o fenômeno normal da hemostasia, que compreende um conjunto de mecanismos que visam interromper a perda continuada de sangue.

A hemostasia é o resultado da ação conjunta de três mecanismos principais e independe da causa da lesão do vaso sanguíneo, que pode ser consequência de trauma, infecção, ruptura espontânea ou da secção cirúrgica planejada.

Os três mecanismos devem atuar em perfeita harmonia para que a hemostasia seja completa. A ausência ou a disfunção de qualquer um dos mecanismos torna a hemostasia deficiente e perpetua a perda sanguínea.

Assim, deve haver um equilíbrio que evite o extravasamento ou perda de sangue e a formação de trombos. A esse equilíbrio chamamos **Hemostasia**. Esse processo envolve quatro sistemas relacionados: os vasos sanguíneos, as plaquetas, os fatores da coagulação e a fibrinólise.

FUNÇÃO DOS VASOS SANGÜÍNEOS NA HEMOSTASIA

Os vasos sanguíneos são recobertos internamente por uma camada celular chamada **endotélio**, e logo abaixo deste endotélio temos uma camada rica em **colágeno**. A integridade desse endotélio pode garantir o perfeito funcionamento do mecanismo de hemostasia. Porém, quando um vaso sanguíneo é lesado, para que seja contido o extravasamento de sangue, inicia-se uma série de reações. Uma dessas reações é a **vaso constricção**, ou seja, o estreitamento do diâmetro do vaso para reduzir a quantidade de sangue que chega naquele ponto lesado. Se o vaso é pequeno, como os capilares, pode selar-se, se as pontas cortadas se tocarem. Mas, se o vaso é de maior calibre, a lesão não é contida apenas com a vaso constricção. Neste caso, o colágeno exposto com a lesão vai estimular a ação das plaquetas sobre o local lesado.

FUNÇÃO DAS PLAQUETAS NA HEMOSTASIA

As plaquetas têm o formato de um disco redondo enquanto circulam na corrente sanguínea. Todavia, as plaquetas sofrem uma mudança no formato quando entram em contato com o colágeno exposto na parede do vaso sanguíneo lesado. Este contato com o colágeno inicia a **adesão plaquetária**, o ato em que as plaquetas individualmente aderem à ponta lesada do vaso. Para essa adesão plaquetária ocorrer de forma efetiva, é necessário uma proteína do plasma denominada **fator de Von Willebrand**.

Assim que as plaquetas aderem à superfície do vaso, tornam-se ativadas. Estas plaquetas ativadas perdem sua forma normal de disco e intumescem, tornando-se mais esféricas. Ao mesmo tempo, formam numerosas projeções espiculares, tornam-se pegajosas e começam a se unir uma às outras. Este processo é chamado de **agregação plaquetária**. Por causa do grande número de plaquetas presentes no sangue circulante, um tampão de plaquetas forma-se em poucos segundos para estancar o sangramento, em casos de pequenas lesões.

O tampão plaquetário, embora seja um agregado frouxo de plaquetas, pode interromper o sangramento, se o orifício do vaso lesado for pequeno. Nas lesões maiores, porém, o tampão plaquetário

que se formou, apesar de aumentar e se organizar, é ainda instável e pode ser arrastado pela corrente sanguínea e diluir-se. Torna-se necessária, portanto, a formação de um coágulo sanguíneo para completar a hemostasia.

FORMAÇÃO DO COÁGULO

A modificação de um conjunto de proteínas do plasma constitui o mecanismo final da hemostasia, que forma um coágulo no local da lesão do vaso. Estas proteínas são denominadas **Fatores da Coagulação**. O coágulo, então, é o resultado de alterações complexas nos fatores da coagulação, cuja etapa final é a transformação do fibrinogênio em fibrina.

O fibrinogênio é um importante fator da coagulação produzido pelo fígado e a fibrina é a matriz protéica do coágulo. Esta forma um emaranhado semelhante a uma rede, na qual ficam retidas as plaquetas e as hemácias que participam da composição do coágulo.

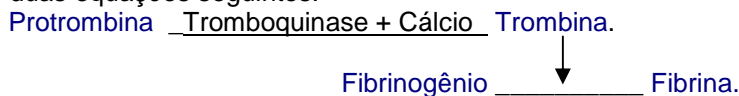
Após qualquer lesão vascular, um coágulo começa a ser formado em 15 a 20 segundos. Em cerca de 3 a 6 minutos, a lesão do vaso é completamente ocluída pelo coágulo.

OS FATORES DA COAGULAÇÃO

Os fatores da coagulação são proteínas do plasma que circulam no sangue sob a forma inativa, exceto o **fator IV** que é o mineral **Cálcio**. Quando um vaso é lesado, uma série de reações complexas leva à ativação dos fatores da coagulação, resultando na formação de um coágulo de fibrina. Os fatores da coagulação são numerados de I a XIII, na ordem pela qual foram descobertos e não em sua ordem de ação. Assim, a forma inativa circulante do fator de coagulação é designada pelo seu número e a forma ativa, pelo seu número seguido da letra **a**. Por exemplo, o fator XII ativado é o fator XIIa. Os fatores da coagulação estão listados a seguir:

Fator	Nome
Fator I	Fibrinogênio
Fator II	Protrombina
Fator III	Tromboplastina / fator tecidual
Fator IV	Cálcio
Fator V	Ativador protrombina
Fator VII	Proconvertina
Fator VIII	F.anti-hemofílico
Fator IX	Christmas
Fator X	Stuart
Fator XI	Antecedente tromboplastínico do plasma
Fator XII	Hageman
Fator XIII	Estabilizador de fibrina

A interação dos fatores da coagulação envolve reações muito complexas. Todavia, a reação inteira pode ser resumida nas duas equações seguintes:



O resultado final é um coágulo de fibrina estável para estancar a sangria e após a dissolução do coágulo quando não é mais necessário.

VIAS METABÓLICAS DA COAGULAÇÃO

O processo de coagulação que leva à formação do coágulo de fibrina envolve três importantes vias metabólicas: a via intrínseca, a via extrínseca e a via comum.

A **Via Extrínseca** é assim chamada porque um dos fatores da coagulação que a compõe não está presente na circulação sanguínea. É o fator III ou fator tissular (tromboplastina), que é liberado quando o vaso sanguíneo é lesado. A tromboplastina age ativando o fator VII. O cálcio é necessário para que ocorra esta ativação. O fator VII ativado (fator VIIa) participa da ativação do fator X a fator Xa.

A **Via Intrínseca** é composta por fatores essencialmente circulantes, ou seja, todos os seus fatores estão presentes na circulação sanguínea. Esta via é iniciada quando o fator XII, o chamado fator de contato, entra em contato com certas superfícies que o ativam para formar o fator XIIa. A reação final da via intrínseca é a ativação do fator VIII a fator VIIIa. Este último, por sua vez, ativa, juntamente com o fator VIIa (da via extrínseca), o fator X a fator Xa. A via intrínseca pode ser ativada pelo contato do fator XII com

várias superfícies como, por exemplo, a agulha e a seringa ou o tubo de vidro usado durante a coleta de sangue.

A **Via Comum** é ativada quando, ou pela via intrínseca ou pela extrínseca, o fator X é ativado a fator Xa. O restante da cadeia de ativação de fatores segue uma via comum. Uma reação complexa resultante da atuação do fator Xa, do cálcio e do fator Va leva à ativação da protrombina a trombina. A trombina, então, age como ativadora do fibrinogênio, levando à formação da fibrina. O coágulo de fibrina, porém, não é estável até que o fator XIII ativado (fator XIIIa) a torne suficientemente estável para conter uma hemorragia. O fator XIIIa é também muito importante no processo de cicatrização. Tem sido observado que pacientes com deficiência do fator XIII demoram a cicatrizar.

FIBRINÓLISE

Após o coágulo de sangue ter servido na função de estancar a hemorragia, deverá ser dissolvido. Este processo é chamado **fibrinólise**. Dois importantes componentes atuam neste processo: o plasminogênio e a plasmina. O plasminogênio encontra-se na circulação e deve ser ativado para chegar a plasmina que vai acelerar o processo de destruição do coágulo.

Quando colocamos sangue em um tubo de ensaio, somente o mecanismo intrínseco desencadeia a coagulação, o vidro das paredes do tubo de ensaio, ativa o fator XII e as plaquetas. A principal diferença entre os dois mecanismos é que a via intrínseca é mais lenta que a extrínseca.

A trombose nada mais é do que a exacerbação do mecanismo de coagulação com o seu controle fibrinolítico alterado, levando à formação de uma massa granulosa, seca e opaca como produto final, ao contrário do coágulo, que tem superfície brilhante e úmida, estrutura homogênea, é elástico e não adere à parede vascular ou cardíaca. Em autópsias, por exemplo, às vezes é necessário fazer uma distinção meticulosa entre ambas as massas plaquetárias, tal a semelhança entre os seus mecanismos geradores, porém, com significados clínicos discrepantes.

COAGULOGRAMA

Os métodos laboratoriais para o diagnóstico das desordens hematológicas são considerados a seguir. Para este estudo, porém, torna-se importante dividi-los em dois grupos. O primeiro grupo que corresponde aos testes que avaliam o primeiro momento do sistema hemostático, no qual atuam os vasos sangüíneos e as plaquetas e o segundo grupo que corresponde aos testes que avaliam o segundo momento no qual atuam os fatores da coagulação.

Para avaliar o primeiro tempo de hemostasia, os principais exames são:

- Tempo de sangria,
- Prova do laço,
- Contagem de plaquetas
- Agregação plaquetária.

Para avaliar o segundo tempo de hemostasia, também chamado de tempo plasmático, os principais exames são:

- Teste de coagulação,
- Tempo de protrombina (TP),
- Tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA)
- Dosagem de fibrinogênio.

Neste material, enfatizaremos os testes de TP, TTPA e Fibrinogênio que avaliam o segundo tempo da hemostasia e são os produtos comercializados pela Labtest.

TEMPO DE PROTROMBINA

O tempo de protrombina ou tempo de Quick é realizado adicionando-se ao plasma descalcificado pelo citrato, um excesso de fator tecidual (tromboplastina). Considerando que a protrombina é convertida em trombina num tempo uniforme, a adição de cálcio com quantidade conhecida de cloreto de cálcio produz a coagulação do plasma. O tempo entre a adição do cálcio e a coagulação é chamado tempo de protrombina.

O tempo de protrombina é um teste para avaliar a via extrínseca e a via comum, ou seja, os fatores VII, X, V, II e o fibrinogênio. Assim, o tempo de protrombina estará aumentado em casos de deficiência de fibrinogênio e de qualquer um dos fatores mencionados anteriormente, em pacientes que fazem uso de

anticoagulantes, nas doenças hepáticas e deficiência de vitamina K, pois os fatores II, VII e X são dependentes desta vitamina.

O teste pode auxiliar no acompanhamento do uso de anticoagulantes e na avaliação do risco cirúrgico.

O tempo de protrombina ou TP, consiste na determinação do tempo de coagulação de um Plasma citratado, após a adição de tromboplastina (fator III) e de cálcio, à 37°C. A adição de um excesso de tromboplastina promoverá a ativação de todo o fator VII contido na amostra de plasma. O fator VIIa assim ativado, ativará o fator X, iniciando a via comum da coagulação. Desta forma, o TP mede os fatores envolvidos na Via Extrínseca e na Via Comum

A tromboplastina é um reagente obtido no cérebro humano, de coelho de boi ou de macaco. Ele contém o fator tissular, composto por uma parte protéica e uma parte fosfolipídica que substitui o fator 3 plaquetário (F3P), na ativação dos fatores que se ligam a fosfolipídeos de membrana. O TP é sensível a redução dos fatores: VII, X, V, II e I. O TP é teste mais sensível para avaliação da redução dos fatores vitamina K dependentes (II, VII, IX e X), sendo o teste usado no controle de paciente em uso de anticoagulante orais.

RNI (RELAÇÃO NORMALIZADA INTERNACIONAL)

Como são usados diferentes tipos de fator tissular no reagente de TP, a Organização mundial de Saúde preconizou o uso do RNI para padronizar mundialmente o resultado obtido durante o teste. Isso significa que o resultado do RNI é praticamente o mesmo se usado em diferentes laboratórios no mundo inteiro.

O RNI nada mais é do que o TP corrigido a padrões mundiais. O uso de anticoagulantes orais é avaliado somente pelo RNI.

Para o cálculo do RNI, cada fabricante do fator tissular fornece o ISI (Índice de Sensibilidade Internacional), que normalmente fica entre 1,0 e 2,0.

A Labtest trabalha com o ISI inferior a 1,23.

Os fabricantes atribuem os valores do ISI para cada lote de reagente preparado.

TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

É o tempo medido entre a adição de cálcio, na presença de uma cefalina (fator de contato) e a coagulação do plasma. A presença de um fator de contato (cefalina) ativa as reações da via intrínseca da coagulação. O tempo de tromboplastina parcial corresponde ao tempo gasto para ocorrer à coagulação do plasma recalcificado em presença de cefalina.

O TTPA estará aumentado quando o paciente tiver deficiência de fatores da via intrínseca (XII, XI, IX e VII) e de fatores da via comum (X, V, II e fibrinogênio). É o caso de pacientes com hemofílias A e B, doenças hepáticas, uso de anticoagulantes e deficiência de vitamina K, uma vez que os fatores II, IX e X dependem desta vitamina.

O TTPA consiste na determinação do tempo de coagulação do PPP (Plasma Pobre em Plaquetas) citratado, após a adição de um ativador da fase de contato da coagulação (por isso é dito "ativado"), e de um reagente, a cefalina, que substitui o fosfolipídio da membrana plaquetária ou F3P, uma vez que se trabalha com o PPP. O último reagente a ser adicionado é o cálcio, que reverte à ação do citrato.

O ativador da fase de contato pode ser o caolim, o ácido elágico, a celite ou ainda o dextram. Este ativador que é colocado em excesso vai ativar o fator XII, na presença de precalicreína e cininogênio de alto peso molecular, e o fator XIIa vai transformar o fator XI em XIa. O XIa ativa o fator IX em IXa, e este junto com o fator VIII-C que atua como cofator vai ativar o fator X. Esta é a chamada Via Intrínseca da coagulação. O fator Xa inicia então a Via Comum, ativando o fator II na presença de fator V e do F3P, que no TTPA é representado pela cefalina. O fator IIa ou trombina, coagula então o fibrinogênio, transformando-a em fibrina.

A cefalina é um fosfolipídeo extraído de cérebro de maneira semelhante à tromboplastina, mas com a diferença que a cefalina não possui atividade de fator tissular, isto é, não é capaz de ativar o fator VII (por isso ela é chamada tromboplastina parcial).

FIBRINOGENIO

O fibrinogênio (fator I) é uma glicoproteína sintetizada no fígado e está envolvida na etapa final da coagulação, que consiste na sua conversão em fibrina, sob a ação da trombina.

O Fibrinogênio é uma proteína importante na resposta de **fase aguda**, pode se encontrar valores elevados em processos inflamatórios.

Aplicações práticas:

- **Hiperfibrinogenemia:** elevação em diferentes patologias: Processos inflamatórios e infecciosos agudos, traumas, neoplasias, pós-operatório, uso de anticoncepcionais orais, etc.

- **Hipofibrinogenemia:** diminuição da produção hepática.
- **Via comum** da cascata.
- Indicação: após resultados alterados para APTT e PT.
- Risco de trombose arterial e venosa.

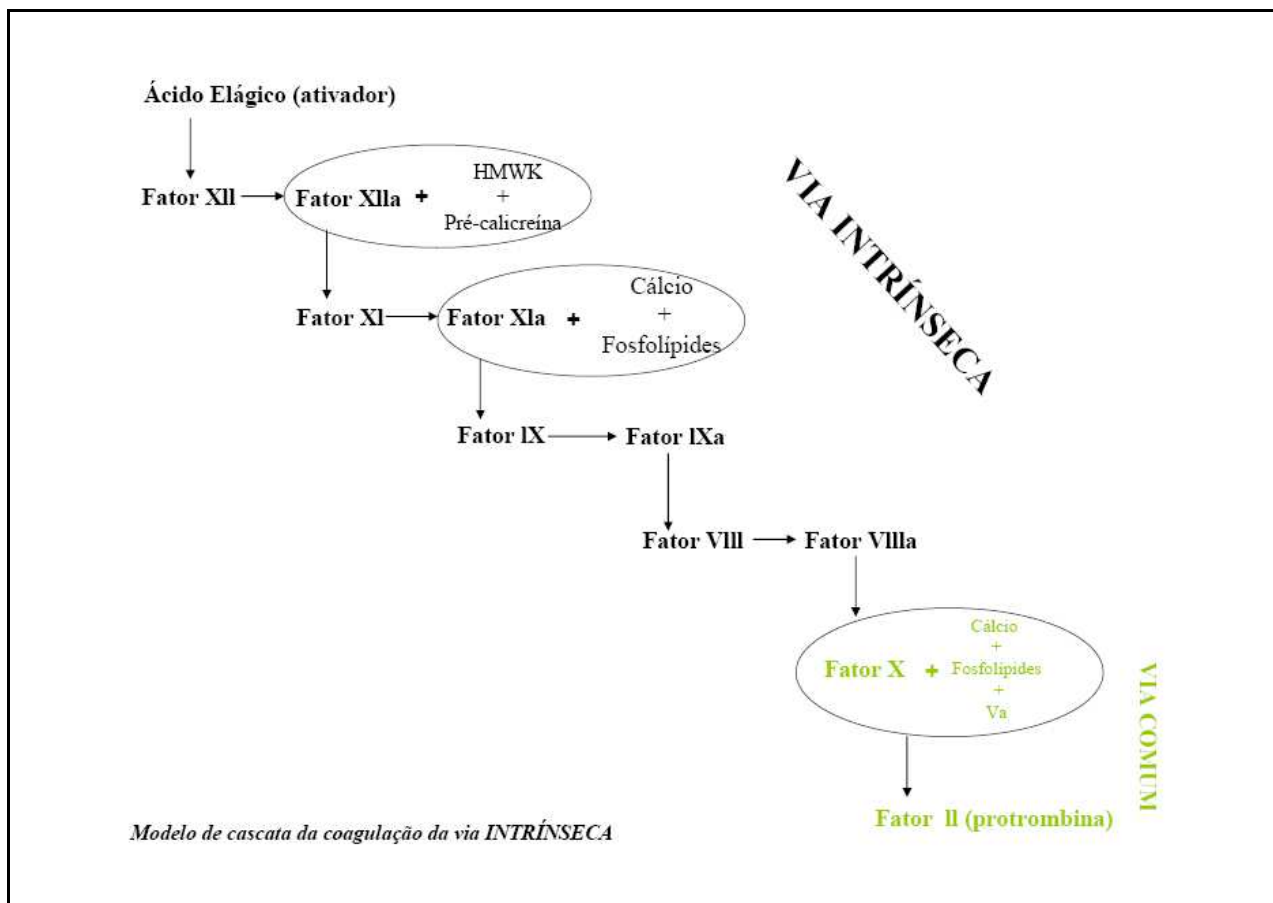
APTT HEMOSTASIS REF. 502

TTPA (Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada) é o tempo medido entre a adição de cálcio, na presença de um ativador (fator de contato – ácido elálgico) e a coagulação do plasma. O TTPA avalia as vias intrínseca e comum da cascata da coagulação. O TTPA estará aumentado quando o paciente apresentar deficiência de fatores da via intrínseca (XII, XI, IX e VIII) e da via comum (X, V, II e I). O TTPA pode ser utilizado também com sucesso para monitorar pacientes em terapia com heparina.

PRINCÍPIO DA REAÇÃO

O reagente contendo ativador plasmático (ácido elálgico) desencadeia o mecanismo de coagulação da via intrínseca através da ativação do fator XII (Hageman), que forma um complexo com o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) e com a pré-caliceína (PK). O fator XII ativado atua sobre o fator XI gerando o fator XI ativado que na presença de fosfolípidos e cálcio transforma o fator IX em uma enzima ativa (fator IXa), que ativa o fator VIII, formando o complexo IXa-fosfolípide-VIIIa que ativa o fator X. Esse fator ativado transforma a protrombina em trombina que atua sobre o fibrinogênio gerando fibrina. A fibrina é macroscopicamente demonstrada pelo aparecimento de um coágulo.

O TTPA é realizado incubando o plasma citratado com o reagente contendo ativador e fosfolípidos. Após a adição de cálcio, faz-se a medição do tempo de formação do coágulo.



APRESENTAÇÃO

Ref. **502-1/4**
 502.1 - Reagente 1 4 mL
 502.2 - Reagente 2 6 mL

Temperatura Armazenamento: 2 - 8 °C



ESPECIFICAÇÕES

Metodologia:	Coagulometria
Aplicação:	Manual, semi-automático e automático.
Amostra:	Plasma (colhido em citrato trissódico anidro 109 mmol/L – 3,2%)
Volume Reagente 1:	0,1 mL
Volume amostra:	0,1 mL
Volume Reagente 2:	0,1 mL

ESPECIFICAÇÕES QUALIDADE ANALÍTICA (Labtest 2014)

EQA – Especificação: Desejável

Erro Total: $\leq 4,5\%$ Biais: $\leq 2,3\%$ CVa: $\leq 1,4\%$

REAGENTE DE TRABALHO

- ▶ O uso dos reagentes se faz obrigatoriamente com aplicação bi-reagente.
- ▶ O produto pode ser empregado para determinação do TTPA utilizando equipamentos automáticos, semiautomáticos e manuais.
- ▶ Os reagentes quando não abertos e mantidos nas condições propostas pelo fabricante, são estáveis até a data de expiração impressa no rótulo. Após abertos sua estabilidade pode ser reduzida por diversos fatores como: ponteiros mal lavadas introduzidas ao reagente, exposição prolongada do Reagente 1 ao ar atmosférico e temperatura “ambiente” (expor somente o necessário para realização dos testes).

ORIENTAÇÕES

- ▶ Devido ao baixo custo do Reagente 2 (Cloreto de Cálcio), apresenta um volume maior do que o Reagente 1. Conforme a apresentação do produto, resultará em sobra do Reagente 2, o que não caracteriza desvantagens ao cliente.
- ▶ Consultar sempre as instruções de uso do produto.
- ▶ Sugere-se utilizar **Qualitrol Hemostasis I Ref. 507, Qualitrol Hemostasis II Ref. 508 ou Qualitrol Hemostasis I/II Ref.509** para controle interno da qualidade.

INTERFERENTES

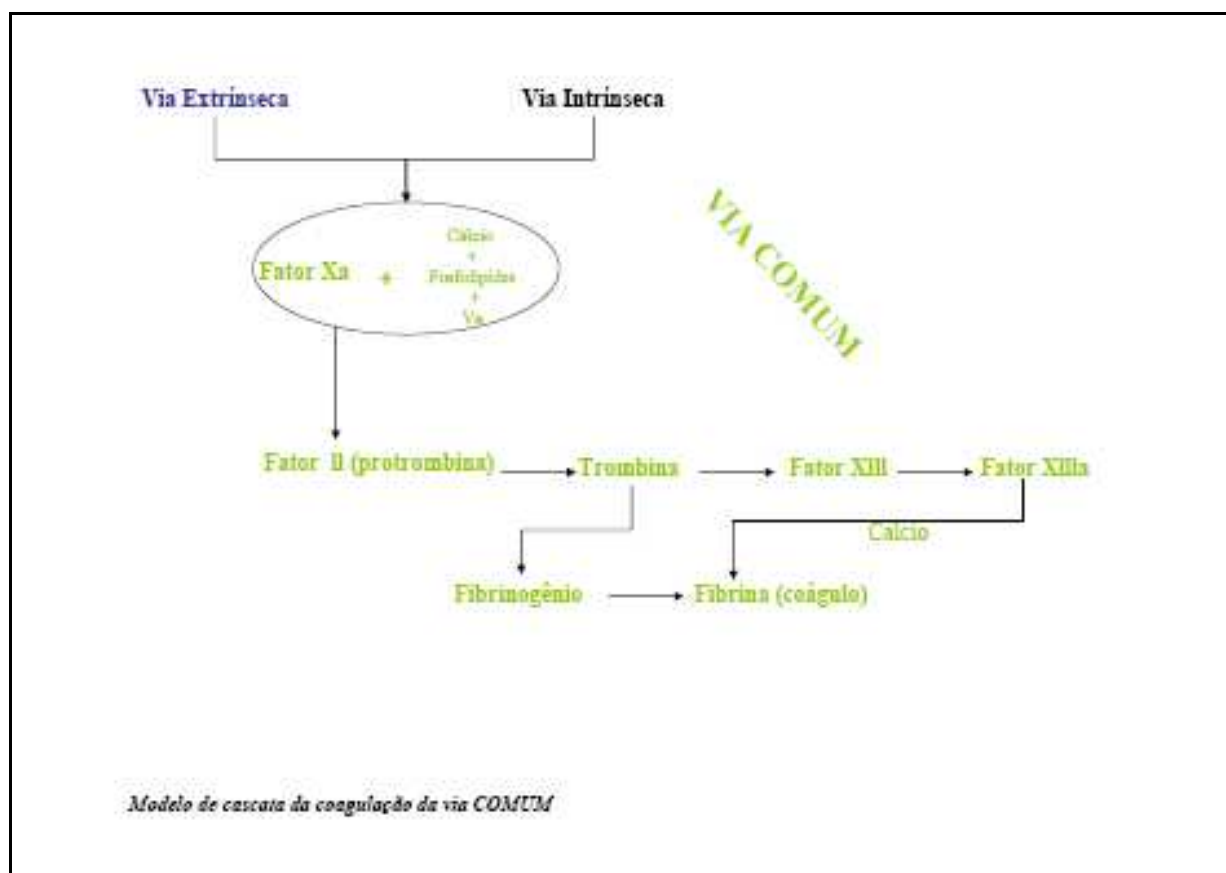
- ▶ O TTPA pode estar aumentado em indivíduos em uso de ácido acetilsalicílico, aztreonam, ofloxacino, metronidazol e fenitoína.
- ▶ A redução do TTPA pode ser observada em indivíduos em uso de anti-histamínicos, digitálicos, contraceptivos orais, tetraciclina e estrógenos conjugados.
- ▶ É importante também que a amostra seja coletada, preparada e armazenada conforme orientações no item AMOSTRA na Instrução de Uso.
- ▶ Amostras ictericas, lipêmicas e hemolisadas podem modificar os resultados de modo imprevisível.
- ▶ Materiais sujos (tubos e ponteiros), temperatura não controlada, contaminação dos reagentes.

FIBRINOGEN HEMOSTASIS REF. 503

O fibrinogênio é uma glicoproteína sintetizada no fígado, sendo a principal fonte de muitos fatores de coagulação, além de constituir um fator de risco para a coronariopatia e o acidente vascular cerebral. É uma proteína importante na resposta de processos inflamatórios de fase aguda. Sua determinação pode auxiliar na distinção das coagulopatias adquiridas, coagulação intravascular disseminada, na fibrinólise primária e secundária, na hipofibrinogenemia e hiperfibrinogenemia.

PRINCÍPIO DA REAÇÃO

Uma quantidade padronizada de trombina é adicionada a uma amostra de plasma citratado diluído e o tempo de coagulação é medido. Na presença de concentração elevada de trombina, o tempo de coagulação do plasma citratado diluído é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio. Para obter a concentração de fibrinogênio, o tempo de coagulação de um plasma é comparado com os tempos de coagulação de uma série de diluições de um plasma contendo concentração conhecida de fibrinogênio.



APRESENTAÇÃO

Ref.	503-5/2
503.1 - Reagente 1 (Tampão)	135 mL
503.2 - Reagente 2 (Trombina Bovina)	2 mL
503.3 - Reagente 3 (Plasma Referência)	1 mL



Temperatura Armazenamento: 2 - 8 °C

ESPECIFICAÇÕES

Metodologia:	Coagulometria
Aplicação:	Manual, semi-automático e automático.
Amostra:	Plasma (colhido em citrato trissódico anidro 109 mmol/L – 3,2%)
Volume Reagente 2:	0,1 mL
Volume Amostra:	0,2 mL (amostra diluída 1:10 com Reagente1).

ESPECIFICAÇÕES QUALIDADE ANALÍTICA (Labtest 2014)

EQA – Especificação: Desejável

Erro Total: ≤13,6%

Bias: ≤4,8%

CVa: ≤5,4%

REAGENTE DE TRABALHO

▶ O Reagente 1 (Tampão) é pronto para uso e deve ser utilizado na diluição das amostras, calibrador e controles. Reagente ligeiramente turvo. Homogeneizar antes de usar.

▶ O Reagente 2 (Trombina Bovina) apresenta-se liofilizado e deve ser preparado com o uso de água própria para laboratório (tipo I ou II). Adicionar água conforme indicado no rótulo do produto. Recolocar a tampa, homogeneizar suavemente e deixar em repouso (entre 15 – 25 °C) durante 15 minutos. Antes de utilizar, homogeneizar suavemente. Não agitar por inversão ou vigorosamente. **O**

O reagente reconstituído é estável por 7 dias entre 2 – 8°C, 24 horas entre 15 – 30°C e 30 dias quando congelado nas primeiras 4 horas após reconstituição. Descongelar rapidamente a 37°C. (congelar e descongelar uma única vez).

▶ O Reagente 3 (Plasma Referência) apresenta-se liofilizado e deve ser preparado com o uso de água própria para laboratório (tipo I ou II). Adicionar 1 mL de água ao frasco, recolocar a tampa, homogeneizar suavemente até a dissolução completa. Antes de utilizar, homogeneizar suavemente. Não agitar por vigorosamente. **O plasma reconstituído é estável 8 horas entre 2 – 8°C.**

▶ O reagente quando não aberto e mantido nas condições propostas pelo fabricante, é estável até a data de expiração no rótulo.

▶ O produto pode ser empregado para determinação do fibrinogênio utilizando equipamentos automáticos e semi-automáticos.

ORIENTAÇÕES

▶ O resultado do paciente e do controle devem ser obtidos usando a curva de calibração.

▶ Se o tempo de coagulação da amostra é menor que o tempo de coagulação da diluição 1:5 da curva de calibração, repetir o teste diluindo a amostra 1:30, ler o resultado na curva de calibração e multiplicar o resultado por 3.

▶ Quando o tempo de coagulação da amostra é maior que o tempo de coagulação da diluição 1:30 da curva de calibração, repetir o teste diluindo a amostra 1:3, ler o resultado na curva e multiplicá-lo por 0,3. Não utilizar diluição inferior a 1:3 porque a presença de interferentes pode produzir resultados inexatos. Se o tempo de coagulação da diluição 1:3 é maior que o maior tempo de coagulação da curva de calibração, o resultado deve ser reportado como menor que a menor concentração da curva de calibração.

▶ O Reagente 1 possui aspecto turvo. Esta característica é uma vantagem exclusiva do produto Labtest que utiliza a tecnologia PCT (Polímero Coloidal Tamponado), proporcionando aumento na caracterização da formação da fibrina.

▶ Para realização da curva, consultar as instruções de uso do produto. Em dosagens manuais, o cliente deve traçar a curva em papel log-log. Entretanto, para otimizar o uso do produto, está disponível no site da Labtest uma planilha para inserção dos dados da curva e amostra, na qual os resultados são calculados automaticamente.

▶ Sugere-se utilizar **Qualitrol Hemostasis I Ref. 507, Qualitrol Hemostasis II Ref. 508 ou Qualitrol Hemostasis I/II Ref.509** para controle interno da qualidade.

INTERFERENTES

▶ O fibrinogênio pode estar aumentado em mulheres em uso de contraceptivos orais, em fumantes e em mulheres grávidas. Como o fibrinogênio é uma das proteínas de fase aguda, pode-se encontrar valores elevados em processos inflamatórios.

▶ Podem ocorrer reduções do fibrinogênio com o uso de clofibrato e dextran, no alcoolismo crônico e por efeito de EDTA.

▶ Níveis elevados de paraproteínas, anticorpos antitrombina e drogas que ativam o sistema fibrinolítico podem interferir com a dosagem de fibrinogênio.

▶ Congelamento e descongelamento de plasma contendo células podem gerar membranas celulares danificadas que modificam os resultados de modo imprevisível.

▶ Amostras ictericas, lipêmicas e hemolisadas podem modificar os resultados de modo imprevisível.

Materiais sujos (tubos e ponteiras), temperatura não controlada, contaminação dos reagentes e amostras;

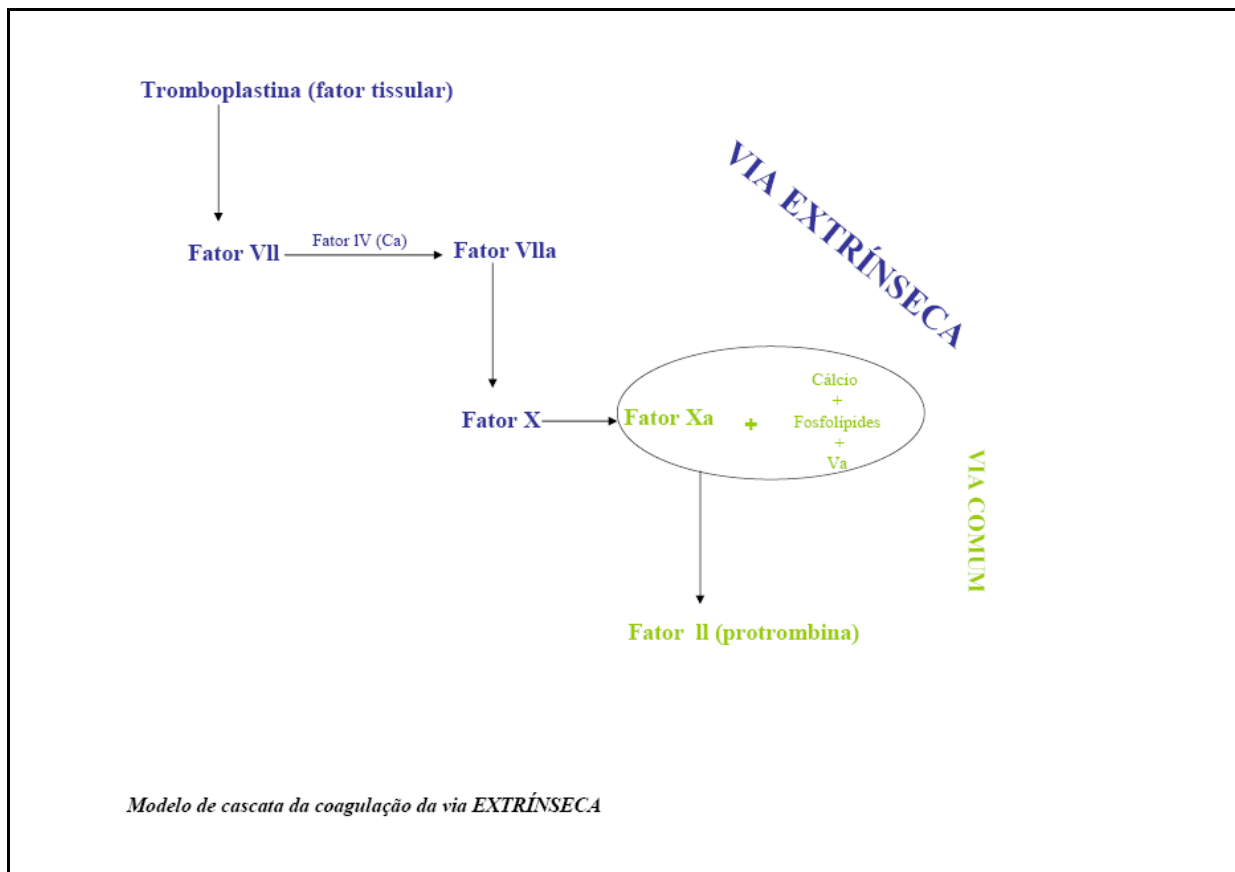
PT REF. 504

O Tempo de Protrombina (TP) é usado como ferramenta de triagem e como um teste quantitativo para fatores de coagulação nas vias extrínsecas e comuns da coagulação. Este teste será prolongado em pacientes com distúrbios congênitos ou adquiridos que reduzem a atividade dos fatores I (fibrinogênio), II (protrombina), V, VII e X.

O TP é também amplamente utilizado para se monitorar a terapia com anticoagulante oral. Os anticoagulantes orais reduzem a atividade dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (II, VII, IX, X, Proteína C e Proteína S) e se observa um TP prolongado como resultado.

PRINCÍPIO DA REAÇÃO

A tromboplastina (fator tissular, fator III) desencadeia o mecanismo de coagulação da via extrínseca formando, com o fator VII, um complexo estequiometricamente dependente do cálcio. O fator VII é transformado em uma enzima ativa (fator VIIa), que atua sobre o fator X gerando o fator Xa e este juntamente com fosfolípidos do fator tissular, fator Va e cálcio formam o Complexo Ativador da Protrombina, que transforma a protrombina em trombina. Essa, por sua vez, atua sobre o fibrinogênio gerando fibrina. A formação da fibrina é macroscopicamente demonstrada pelo aparecimento de um coágulo. O TP é o tempo necessário para a formação de fibrina após a mistura de tromboplastina, plasma e cálcio. Os resultados são obtidos através da comparação entre os tempos de coagulação do plasma de pacientes e do plasma de referência, representando a medida da atividade dos fatores do complexo protrombínico (fatores II, V, VII, X).



APRESENTAÇÃO

Ref.	504-5/2
504.1 - Reagente 1	2 mL
Ref.	504-5/4
504.1 - Reagente 1	4 mL



Temperatura Armazenamento: 2 - 8 °C

ESPECIFICAÇÕES

Metodologia:	Coagulométrica - Quick
Aplicação:	Manual, semi-automático e automático.
Amostra:	Plasma (colhido em citrato de sódio trissódico anidro 109 mmol/L – 3,2%)
Volume Reagente 1:	0,2 mL
Volume amostra:	0,1 mL

ESPECIFICAÇÕES QUALIDADE ANALÍTICA (Labtest 2005)

EQA – Especificação: Desejável		
Erro Total: ≤5,3%	Bias: ≤2,0%	CVa: ≤2,0%

REAGENTE DE TRABALHO

- ▶ O reagente líquido, pronto para uso.
- ▶ O produto pode ser empregado para determinação do TP utilizando equipamentos automáticos e semiautomáticos.
- ▶ O Reagente quando não aberto e mantido nas condições propostas pelo fabricante, é estável até a data de expiração no rótulo. Após aberto, o reagente é estável por 14 dias de 2 - 8°C. O Reagente 1 deve ser aquecido em recipiente com tampa para evitar sua evaporação. A exposição prolongada ao aquecimento e ar atmosférico pode comprometer seu desempenho. O reagente deve permanecer aberto somente o tempo necessário para se obter o volume a ser utilizado no teste.
- ▶ Deve ser manuseado de acordo com as boas práticas de laboratório para evitar contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade.

ORIENTAÇÕES

- ▶ Preparo do Plasma de Referência: obter através de misturas (pool) de plasmas citratados de, no mínimo, 3 indivíduos sadios. Não usar plasmas de portadores de doenças hepáticas ou de mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos orais.
- ▶ Deve-se obter o tempo do plasma referência para cada lote de PT.
- ▶ Manter registro dos lotes de PT e dos tempos do plasma de referência.
- ▶ Sugere-se utilizar **Qualitrol Hemostasis I Ref. 507, Qualitrol Hemostasis II Ref. 508 ou Qualitrol Hemostasis I/II Ref.509** para controle interno da qualidade.

INTERFERENTES

- ▶ O TP pode estar aumentado em indivíduos em uso de corticoesteróides, contraceptivos orais (falhas na excreção de sais biliares), asparaginase, clofibrato, eritromicina, etanol, tetraciclina, heparina e warfarin, bem como na presença de EDTA.
- ▶ A redução do TP pode ser observada em indivíduos em uso de anti-histamínicos, butabarbital, fenobarbital, contraceptivos orais (diminuição da resposta aos anticoagulantes orais), vitamina K e cafeína.
- ▶ É importante também que a amostra seja coletada, preparada e armazenada conforme orientações no item AMOSTRA nas Instruções de Uso.
- ▶ Amostras ictericas, lipêmicas e hemolisadas podem modificar os resultados de modo imprevisível.
- ▶ Materiais sujos (tubos e ponteiras), temperatura não controlada, contaminação dos reagentes e amostras.

CÁLCULOS

$$R = \frac{\text{Tempo em segundos do plasma do paciente}}{\text{Tempo em segundos do plasma referência}}$$

R: Relação

$$RNI = R^{ISI}$$

Segundo a OMS, todos os resultados, independentes da finalidade do teste devem ser relatados em atividade e RNI.

USO DA TABELA

Vide tabelas respectivas de cada lote.

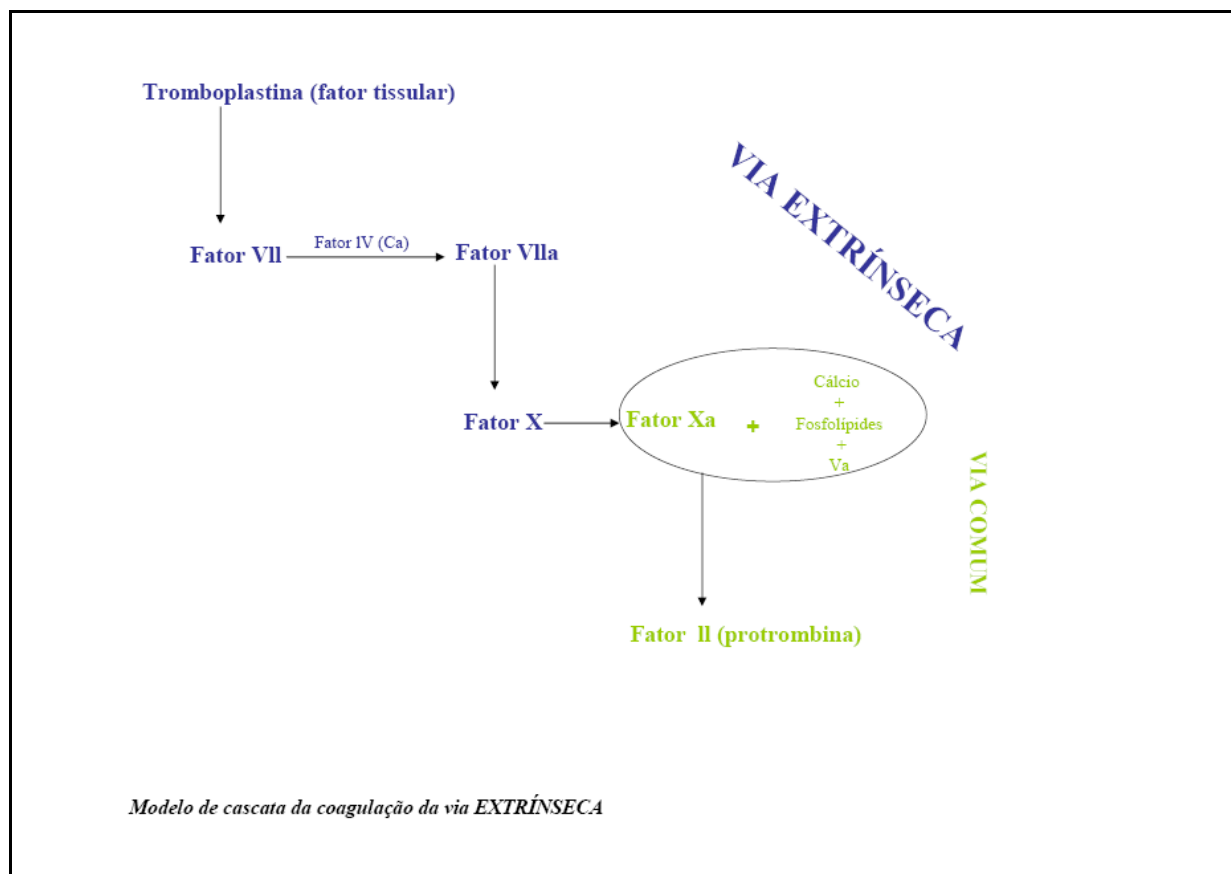
PT HEMOSTASIS REF. 501

O Tempo de Protrombina (TP) é usado como ferramenta de triagem e como um teste quantitativo para fatores de coagulação nas vias extrínsecas e comuns da coagulação. Este teste será prolongado em pacientes com distúrbios congênitos ou adquirido que reduzem a atividade dos fatores I (fibrinogênio), II (protrombina), V, VII e X.

O TP é também amplamente utilizado para se monitorar a terapia com anticoagulante oral. Os anticoagulantes orais reduzem a atividade dos fatores de coagulação dependentes da vitamina K (II, VII, IX, X, Proteína C e Proteína S) e se observa um TP prolongado como resultado.

PRINCÍPIO DA REAÇÃO

A tromboplastina (fator tissular, fator III) desencadeia o mecanismo de coagulação da via extrínseca formando, com o fator VII, um complexo estequiometricamente dependente do cálcio. O fator VII é transformado em uma enzima ativa (fator VIIa), que atua sobre o fator X gerando o fator Xa e este juntamente com fosfolípidos do fator tissular, fator Va e cálcio formam o Complexo Ativador da Protrombina, que transforma a protrombina em trombina. Essa, por sua vez, atua sobre o fibrinogênio gerando fibrina. A formação da fibrina é macroscopicamente demonstrada pelo aparecimento de um coágulo. O TP é o tempo necessário para a formação de fibrina após a mistura de tromboplastina, plasma e cálcio. Os resultados são obtidos através da comparação entre os tempos de coagulação do plasma de pacientes e do plasma de referência, representando a medida da atividade dos fatores do complexo protrombínico (fatores II, V, VII, X).



APRESENTAÇÃO

Ref.	501-5/2
501.1 - Reagente 1	2 mL
Ref.	501-5/4
501.1 - Reagente 1	4 mL



Temperatura Armazenamento: 2 - 8 °C

ESPECIFICAÇÕES

Metodologia:	Coagulometria - Quick
Aplicação:	Manual, semi-automático e automático.
Amostra:	Plasma (colhido em citrato trissódico anidro 109 mmol/L – 3,2%)
Volume Reagente 1:	0,2 mL
Volume amostra:	0,1 mL

ESPECIFICAÇÕES QUALIDADE ANALÍTICA (Labtest 2005)

EQA – Especificação: Desejável		
Erro Total: ≤5,3%	Bias: ≤2,0%	CVa: ≤2,0%

REAGENTE DE TRABALHO

- ▶ O reagente apresenta-se liofilizado e deve ser preparado com o uso de água própria para laboratório (tipo I ou II). Adicionar ao frasco do reagente R1 o volume exato de água indicado no rótulo. Recolocar a tampa, homogeneizar suavemente e deixar em repouso (entre 15 – 25 °C) durante 15 minutos. Antes de utilizar, homogeneizar suavemente. Não agitar por inversão ou vigorosamente.
- ▶ O produto pode ser empregado para determinação do TP utilizando equipamentos automáticos e semi-automáticos.
- ▶ O Reagente quando não aberto e mantido nas condições propostas pelo fabricante, é estável até a data de expiração no rótulo. Após aberto e reconstituído, o reagente deve ser manuseado de acordo com as boas práticas de laboratório para evitar contaminações de natureza química e microbiana que podem provocar redução da estabilidade. Para preservar o desempenho, manter o reagente fora da temperatura de armazenamento (2 – 8°C) somente pelo tempo mínimo necessário. **Não congelar.**
- ▶ **O Reagente reconstituído é estável 7 dias entre 2 – 8°C, 8 horas a 37°C e 24 horas a temperatura ambiente (entre 15 – 25°C).**

ORIENTAÇÕES

- ▶ Preparo do Plasma de Referência: obter através de misturas (pool) de plasmas citratados de, no mínimo, 3 indivíduos saudáveis. Não usar plasmas de portadores de doenças hepáticas ou de mulheres grávidas ou em uso de contraceptivos orais.
- ▶ Deve-se obter o tempo do plasma referência para cada lote de PT Hemostasis.
- ▶ Manter registro dos lotes de PT Hemostasis e dos tempos do plasma de referência.
- ▶ Sugere-se utilizar **Qualitrol Hemostasis I Ref. 507, Qualitrol Hemostasis II Ref. 508 ou Qualitrol Hemostasis I/II Ref.509** para controle interno da qualidade.

INTERFERENTES

- ▶ O TP pode estar aumentado em indivíduos em uso de corticoesteróides, contraceptivos orais (falhas na excreção de sais biliares), asparaginase, clofibrato, eritromicina, etanol, tetraciclina, heparina e warfarin, bem como na presença de EDTA.
- ▶ A redução do TP pode ser observada em indivíduos em uso de anti-histamínicos, butabarbital, fenobarbital, contraceptivos orais (diminuição da resposta aos anticoagulantes orais), vitamina K e cafeína.
- ▶ É importante também que a amostra seja coletada, preparada e armazenada conforme orientações no item AMOSTRA nas Instruções de Uso.
- ▶ Amostras ictericas, lipêmicas e hemolisadas podem modificar os resultados de modo imprevisível.
- ▶ Materiais sujos (tubos e ponteiros), temperatura não controlada, contaminação dos reagentes e amostras,

CÁLCULOS

$$R = \frac{\text{Tempo em segundos do plasma do paciente}}{\text{Tempo em segundos do plasma de referência}}$$

R: Relação

$$\text{RNI} = R^{1SI}$$

Segundo a OMS, todos os resultados, independente da finalidade do teste, devem ser relatados em atividade e RNI.

USO DA TABELA

15/01/2009

Revisão: 25/11/2016

GUIA TÉCNICO - COAGULAÇÃO



Vide tabelas respectivas de cada lote.

CONTROLE

No laboratório clínico o controle (soro controle) desempenha o papel de aferidor da qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos. Os controles são utilizados para monitorar a precisão do ensaio.

DESCRIÇÃO

Qualitrol Hemostasis é uma preparação liofilizada de plasma humano destinado ao controle interno da qualidade e na verificação de desvios da calibração para ensaios de Tempo de Protrombina (PT ou TP), Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado (APTT ou TTPA) e Fibrinogênio.

A utilização dos controles Qualitrol Hemostasis 1 – Ref. 507 e Qualitrol Hemostasis – Ref. 508 permite a verificação precisão do processo analítico em diferentes níveis hemostáticos, possibilitando a aplicação das regras múltiplas de controle. Estas são poderosas ferramentas para se obter ganhos de qualidade e produtividade, minimizando repetições ocasionadas por sinais de falsa rejeição que ocorrem frequentemente quando se usa controle em um só nível hemostático.

APRESENTAÇÃO

Ref. 507-6
Qualitrol 1 Hemostasis 6 x 0,5 mL

Ref. 508-1
Qualitrol 2 Hemostasis 6 x 0,5 mL

TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO

Entre 2 - 8 °C.

ARMAZENAMENTO

- ▶ Seguir estritamente as orientações de preparação contidas nas Instruções de Uso.
- ▶ **Não congelar.**
- ▶ Controles do mesmo lote, quando reconstituídos, podem ser concentrados em um mesmo frasco, desde que seja o frasco original de comercialização. Não transferir o conteúdo para frascos diferentes dos originais, pois a estabilidade pode ser comprometida.
- ▶ Manter o Qualitrol Hemostasis o mínimo de tempo possível aberto, fora da temperatura de armazenamento ou exposto a luz.
- ▶ Verificar a correspondência entre o lote impresso na Instrução de Uso e o lote constante no frasco do Qualitrol Hemostasis.

ESTABILIDADE

- ▶ Quando reconstituídos, estáveis 8 horas se armazenados entre 2 e 8 °C.

CONTROLE DA QUALIDADE

▶ Vários fatores alteram os resultados obtidos com o Qualitrol H. Dentre estes fatores estão os erros de reconstituição, homogeneização, contaminação da água ou vidraria, controle inadequado da temperatura ou erros técnicos associados ao instrumento ou sistema de reagentes. Sugerimos o seguimento das boas práticas de laboratório e a verificação das instruções do fabricante do instrumento e dos reagentes utilizados, relacionadas com as limitações do procedimento.

▶ A existência de bolhas nos controles, amostras e/ou reagentes durante a execução do teste é causa comum de erros nas aplicações em sistemas automáticos.

▶ Os valores constantes nas Instruções de Uso do Qualitrol Hemostasis 1 Ref. 507 e Qualitrol Hemostasis 2 Ref. 508 são preparações estabilizadas de plasma humano e podem ser utilizados com qualquer reagente de coagulação. Entretanto, os valores são atribuídos utilizando o equipamento Cronoquest e os reagentes da Linha Hemostasia da Labtest.

Alterações na sensibilidade dos reagentes e tipos de equipamento utilizados interferem no tempo de coagulação atribuído aos controles.

▶ Não utilizar Qualitrol Hemostasis 1 como substituto para pool de plasma de pacientes normais para realização de ensaios de TTPA e para cálculo de determinação de Relação Normalizada Internacional (RNI).

QUALITROL HEMOSTASIS



- ▶ Qualitrol Hemostasis 1 Ref. 507: Valores de coagulação para Protrombina (PT ou TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT ou TTPA) **próximos** da faixa da normalidade.
- ▶ Qualitrol Hemostasis 2 Ref. 508: Valores de coagulação para Protrombina (PT ou TP) e Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT ou TTPA) **próximos** da faixa patológica (valores alterados).
- ▶ Valores de Fibrinogênio são determinados para ambos os controles, porém não são ajustados e não caracterizam condições de normalidade ou alteração.

COLETA DAS AMOSTRAS

Usar plasma colhido em citrato trissódico anidro 109 mmol/L (3,2%)**.

Deve-se ser criado um Procedimento Operacional Padrão (POP) que estabeleça procedimentos adequados para coleta, preparação e armazenamento da amostra. **Enfatizamos que os erros devidos à amostra podem ser muito maiores que os erros ocorridos durante o procedimento analítico.**

Considerando que a qualidade da amostra é fundamental para a exatidão dos resultados, recomenda-se a utilização dos procedimentos que se seguem:

1. Obter o sangue por punção venosa e evitar garroteamento prolongado, hemólise, formação de bolhas e aspiração de líquido tissular (fator III). A agulha deve penetrar diretamente na veia na primeira tentativa (punção venosa "atraumática"). O sangue deve fluir livremente sem que seja necessário aplicar demasiada força ao êmbolo. Não realizar o teste em amostra cuja punção for difícil (punção traumática).
2. Coletar a amostra com seringa de plástico e centrifugar em tubos de plásticos. O uso de material de vidro não siliconizado ativa os fatores da coagulação e reduz falsamente o tempo de protrombina (PT) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (APTT). Após remover a agulha, utilizar a porção central da amostra na seringa, usando as porções anterior e posterior para outros testes.
3. No caso de sistema de coleta a vácuo, usar tubo de plástico ou vidro siliconizado. Ao realizar coleta somente para testes de coagulação, coletar duas amostras. A primeira em um tubo sem anticoagulante ou em tubo contendo citrato (tampa azul) que deve ser desprezada. A segunda amostra coletada em tubo contendo (tampa azul) será utilizada para a realização dos testes. No caso de coleta múltipla, a amostra para testes de coagulação deverá ser obtida após a coleta de amostra em tubo sem anticoagulante e antes da coleta em tubo contendo EDTA.
4. Misturar 9 partes de sangue com 1 parte de citrato ou 3 mL de sangue e 1 gota de Trombstab (Labtest Ref. 45). Homogeneizar 3 ou 4 vezes por inversão suave. Não usar oxalato, pois o Fator V é muito sensível a este anticoagulante.
5. Em pacientes que apresentam hematócrito maior que 55% a relação entre os volumes de sangue e de anticoagulante deve ser ajustada para garantir a exatidão do resultado. Para calcular o volume de anticoagulante necessário em função do hematócrito e do volume de sangue, utilizar a fórmula que se segue:

Volume de anticoagulante (mL) = 0,00185 x volume de sangue (mL) x (100 -hematócrito).

Exemplo: Para um hematócrito de 60% usar 0,22 mL de citrato e completar para 3,0 mL com sangue. Para usar Trombstab (Labtest Ref. 45), adicionar 2 gotas a 0,5 mL de água e usar na proporção indicada pelo cálculo.

6. Centrifugar até 1 hora após a coleta a 3000 rpm ou 1500 g durante 15 minutos*. Não é necessário remover o plasma do tubo. Manter o tubo tampado até a execução do teste para evitar mudança do pH da amostra, que pode interferir nos resultados.
7. Manter as amostras entre 18 – 24 °C e realizar o teste até 4 horas após a coleta. Não refrigerar o plasma, pois pode haver ativação do Fator VII pelo sistema Calicreína, reduzindo falsamente o TP. Caso exista possibilidade de congelamento rápido, o plasma pode ser congelado a 20 °C negativos por 2 semanas ou 70 °C negativos por 6 meses. Sugerimos congelar o material em alíquotas de 0,5 mL e, para evitar evaporação do material durante o período de armazenamento, utilizar frascos adequados para congelamento ("criotubos"). As amostras devem ser descongeladas rapidamente a 37 °C e testadas imediatamente.
8. A presença de coágulos implica rejeição da amostra.

Amostras de sangue devem ser consideradas como potencialmente infectantes. Portanto, ao manuseá-las devem-se seguir as normas estabelecidas para biossegurança.

Para descartar os reagentes e o material biológico, sugerimos aplicar as normas locais, estaduais ou federais de proteção ambiental.



POSSÍVEIS ERROS: PRÉ-ANALÍTICOS, ANALÍTICOS E PÓS-ANALÍTICOS.

INTRODUÇÃO

“Uma parcela importante dos procedimentos da qualidade assegurada consiste na prevenção dos erros obtida pela otimização dos processos operacionais. Quanto mais organizado é o laboratório, maiores são as possibilidades de eliminar a ocorrência de erros. Portanto, as ações da qualidade assegurada e a otimização da organização do laboratório são somatórias para a redução dos erros nos ensaios”.

Usando Controles – Publicação Labtest.

POSSÍVEIS CAUSAS DE ERROS PRÉ-ANALÍTICOS

- Falta de padronização na coleta:
 - Utilizar anticoagulante incorreto (exemplo: EDTA, Heparina);
 - Seqüência de multicoleta incorreta;
 - Punção traumática (uso de amostra hemolisada);
 - Material inadequado usado na coleta;
 - Preparo do paciente inadequado;
- Identificação incorreta da amostra;
- Troca de amostra;
- Demora na separação do plasma (centrifugação) e processamento;
- Deixar amostra **aberta** ao ambiente;
- Armazenamento inadequado.

POSSÍVEIS CAUSAS DE ERROS ANALÍTICOS

- Não “conhecer” o produto (procedimento).
- Erros na diluição de amostras e na preparação dos reagentes;
- Erros de pipetagem (técnica de pipetagem inadequada);
- Usar ponteiros de tamanho inadequado, mal adaptadas, obstruídas ou sujas;
- Não pipetar amostra ou reagente;
- Contaminação de amostras (heparina) e reagentes;
- Usar instrumentos não calibrados e equipamentos em condição de manutenção precária;
- Utilizar reagentes de diferentes lotes (perda de rastreabilidade);
- Usar água de má qualidade;
- Utilizar produtos vencidos (RDC 302);
- Armazenar reagentes em temperaturas inadequadas.

POSSÍVEIS CAUSAS DE ERROS PÓS-ANALÍTICOS

- Erro na digitação dos resultados;
- Troca de laudos;
- Laudos com dados incompletos;
- Designar uma faixa incorreta de valores esperados (Valores de Referências);

GLOSSÁRIO DAS SIGLAS

A%: Atividade de Protrombina (percentual)

HMWK: Cininogênio de Alto Peso Molecular

ISI: Índice de Sensibilidade Internacional.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

PCT: Polímero Coloidal Tamponado.

PK: Pré-caliceína

PPP: Plasma Pobre em Plaquetas.

PTT, APTT, aPTT, TTPa ou KPTT: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativado.

R: Relação

RNI, INR: Relação Normalizada Internacional.

RPM: Rotações Por Minuto.

TP, TAP: Tempo de Protrombina ou Tempo de Atividade da Protrombina.

REFERÊNCIAS

1. CLIA Requirements for Analytical Quality. Disponível em <http://www.westgard.com/clia.htm>.
2. GUDER WG, et. al. Amostras: do Paciente para o Laboratório. Git Verlag GMBH, 1996. Darmstad.
3. Labtest: Dados de arquivo.
4. Labtest: Instruções de Uso dos produtos da Linha Hemostasis.
5. NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard – Fifth Edition. NCCLS document H3-A5, 2003.