



Soluplastin

Tromboplastina cálcica para a determinação do Tempo de Protrombina em uma etapa

SIGNIFICADO CLÍNICO

O tempo de protrombina ou Tempo de Quick é a prova de triagem mais importante clinicamente na avaliação de distúrbios da via extrínseca da coagulação. A sensibilidade a alterações quali e quantitativas de fatores das vias extrínseca e comum da coagulação permite que seja utilizado para:

- a detecção de deficiências simples ou combinadas de fatores devido a alterações hereditárias ou adquiridas (doenças hepáticas, deficiência de vitamina K, etc.);
- estudos pré-cirúrgicos;
- determinação específica da atividade de fatores II, V, VII e X;
- controle da terapêutica com anticoagulantes orais pela sua sensibilidade a fatores vitamina K dependentes (II, VII e X).

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

O método baseia-se na medição do tempo de formação do coágulo de fibrina, pela adição de uma tromboplastina de cálcio a um plasma citrado.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: tromboplastina liofilizada de cérebro de coelho a uma concentração final de cloreto de cálcio 10 mM.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- Água bidestilada ou deionizada.
- Solução salina.
- **Coagulation Calibrator** da Wiener lab.

INSTRUÇÕES PARA USO

- Abra o frasco quebrando o lacre metálico e remova lentamente a rolha de borracha para evitar perdas do material.
- Adicione o volume de água bidestilada ou deionizada indicado no frasco. Tampe. Deixe repousar por 30 minutos a temperatura ambiente e depois agite suavemente até obter uma suspensão homogênea.
- Volte a homogeneizar quando utilizar novamente a suspensão.

PRECAUÇÕES

O reagente é para uso diagnóstico "in vitro".

Todas as amostras de pacientes devem ser manipuladas como se fossem capazes de transmitir infecção.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análise clínica.

Todos os reagentes e as amostras devem-se descartar conforme à regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

Reagente A: estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicado na embalagem.

Reagente A reconstituído: sob refrigeração (2-10°C) é estável por 5 dias a partir do momento de sua reconstituição. Não congelar.

AMOSTRA

Plasma citrado

a) Coleta: obter o sangue cuidadosamente (evitando estase ou trauma) e colocar em um tubo com anticoagulante na proporção 9 + 1 exatamente (ex.: 4,5 ml de sangue + 0,5 ml de anticoagulante). Misturar suavemente. Centrifugar por 15 minutos a 2500g e separar o plasma antes de 30 minutos. É aconselhável realizar a extração com seringas de plástico.

b) Aditivos: para obter o plasma deve-se utilizar **Anticoagulante TP** de Wiener lab ou citrato de sódio 130 mmol/l (3,8%) ou 109 mmol/l (3,2%).

c) Substâncias interferentes conhecidas:

- a presença de heparina ou EDTA invalida os resultados;
- as contaminações, visíveis ou não, causam tempos falsamente prolongados;
- hemólise e lipemia visíveis dificultam a medição foto-óptica dos resultados.

Referência bibliográfica Young para os efeitos de drogas no presente método.

d) Estabilidade e instruções de armazenamento: o plasma deve ser mantido a temperatura ambiente até o momento de efetuar o ensaio (não armazenar a 2-10°C). No caso de a amostra não se processar dentro das 4 horas contadas desde a coleta, pode ser congelada (a -20°C) por duas semanas. Neste caso, a amostra deve ser congelada imediatamente e deve ser descongelada rapidamente a 37°C, não prolongando-se este período mais de 10 minutos.

MATERIAL NECESSÁRIO

- Tubos de Khan ou hemólise.
- Pipetas e micropipetas para medir os volumes indicados.
- Banho-maria a 37±1°C ou coagulômetro semi-automático ou automático.
- Cronômetro.

PROCEDIMENTO

1- Pré-aquecer o Reagente A a 37°C (não mais do que 20 minutos).

- 2- Em um tubo pré-aquecido a 37°C, colocar 100 ul de amostra.
Incubar 1 minuto em banho-maria a 37°C.
- 3- Disparar o cronômetro com a adição de 200 ul de Reagente A pré-aquecido. Antes do tempo de coagulação estimado, retirar o tubo do banho-maria, deslizando suavemente o líquido a partir do fundo para o meio do tubo e parar o cronômetro no momento da aparecimento do coágulo.
- 4- Registrar o tempo de formação do coágulo.
- 5- Repetir a determinação e calcular a média para cada amostra. Se a diferença entre as repetições é maior do que 5% é aconselhável repetir o procedimento.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados podem ser expressos de diversas formas:

1- **Tempo de protrombina (TP)** em segundos.

2- **Percentual de Atividade de Protrombina (%TP)**

Preparar uma curva de calibração para cada lote de reagente a partir de um plasma calibrador (**Coagulation Calibrator** da Wiener lab.) ou de um pool de plasmas frescos (pelo menos 20 plasmas de indivíduos saudáveis com TP entre 90-110%) utilizando solução salina como diluente:

Curva de Percentual de Atividade de Protrombina

Tubo N°	SS (ml)	Calibrador (ml)	Atividade (%)	Atividade (%)
1	-	1,0	100*	A x 1
2	0,3	0,7	70	A x 0,70
3	0,5	0,5	50	A x 0,50
4	0,7	0,3	30	A x 0,30
5	0,8	0,2	20	A x 0,20
6	0,9	0,1	10	A x 0,10

A preparação das diluições deve se realizar imediatamente antes de realizar a curva.

Determinar o TP de cada diluição em duplicado e representar graficamente em papel milimetrado as médias de TP vs a percentagem de atividade ou em papel log-log para a linearização da curva de calibração.

*Quando é utilizado o kit **Coagulation Calibrator** é considerado como 100% o valor de atividade indicado nas instruções de uso do kit (A) e para as outras diluições deve-se multiplicar este valor pelo fator de diluição realizada.

A curva de calibração deve-se realizar cada vez que seja mudado o lote de reagente ou quando seja indicado pelo controle de qualidade.

Caso seja utilizado um coagulômetro semi-automático, processe as diluições da curva e ingresse as médias de TP obtidas na calibração de TP do instrumento.

Com a calibração carregada no instrumento, os TP de cada amostra vão ser interpolados automaticamente pelo software

do instrumento, obtendo-se em cada caso a atividade de protrombina correspondente.

Caso seja utilizado um coagulômetro automático, as diluições são realizadas pelo instrumento e a partir da curva de calibração obtida, as amostras ensaiadas são informadas com a sua % de atividade de protrombina.

3- Conforme à Organização Mundial de Saúde (OMS), os resultados de TP (segundos) de pacientes tratados com anticoagulantes orais em fase estável, devem ser expresso em INR ou RIN (Razão Internacional Normalizado) para se independizar do sistema de medição (reagente / instrumento) utilizado através da seguinte fórmula:

$$\text{RIN: } (\text{TP paciente} / \text{MNPT})^{\text{ISI}}$$

onde:

TP paciente: média do Tempo de Protrombina do paciente (em segundos).

MNPT: média geométrica do TP da população adulta normal. É calculada para cada lote de reagente com pelo menos 20 amostras de plasma fresco de indivíduos adultos saudáveis. ISI: índice de sensibilidade internacional. É obtido para cada sistema de medição (reagente / instrumento) através das recomendações da OMS.

Para um coagulômetro semi-automático ou automático, ingresse os valores de ISI e MNPT do sistema específico: reagente / instrumento. Assim, as amostras ensaiadas vão ser informadas com o RIN correspondente.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Plasma Control normal - patológico da Wiener lab.

Coagulation Control N - Coagulation Control P da Wiener lab. Os controles são processados da mesma maneira que as amostras.

VALORES DE REFERÊNCIA

70-120%

10 - 14 segundos (faixa indicativa, depende do sistema de medição)

Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência.

As faixas terapêuticas de RIN podem variar de acordo com as indicações da terapia com anticoagulantes orais.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Substâncias interferentes conhecidas em AMOSTRA. Qualquer alteração na coleta da amostra, relação anticoagulante/amostra, processamento ou armazenamento da mesma pode ocasionar resultados errados na determinação. Amostras hemolisadas ou coaguladas devem ser descartadas. As amostras devem ser conservadas a temperatura ambiente para evitar a ativação pela baixa temperatura. Vide AMOSTRA.

A presença de lúpus anticoagulante ou inibidores de trombina podem afetar a determinação produzindo resultados errados. A pré-incubação do reagente a 37°C não deve exceder os 20 minutos. Além disso, é desejável que o reagente reconstituído permaneça no refrigerador quando não estiver em

uso, não permanecendo à temperatura ambiente durante longos períodos.

Uma nova calibração é requerida para cada lote de reagente ou instrumento utilizado.

DESEMPENHO

a) Imprecisão: os estudos de imprecisão foram realizados através do protocolo EP5-A do CLSI processando controles e amostras de pacientes.

Precisão intra-ensaio

Amostra	Nível	D.P.	C.V.
Plasma Control normal	12,5 seg	± 0,1 seg	1,0%
Plasma Control patológico	31,7 seg	± 0,4 seg	1,4%
Pool de plasmas normais	11,2 seg	± 0,1 seg	1,3%
Pool de plasmas patológicos	15,4 seg	± 0,2 seg	1,3%

Precisão total

Amostra	Nível	D.P.	C.V.
Plasma Control normal	12,5 seg	± 0,4 seg	2,9%
Plasma Control patológico	31,7 seg	± 1,0 seg	3,2%
Pool de plasmas normais	11,2 seg	± 0,3 seg	3,0%
Pool de plasmas patológicos	15,4 seg	± 0,4 seg	2,4%

b) Correlação: foram comparados os resultados de RIN em 105 pacientes saudáveis e em fase estável de tratamento com anticoagulantes orais, obtidos com Soluplastin da Wiener lab. e um kit comercial baseado no mesmo princípio, obtendo-se os seguintes parâmetros de correlação:

$$y = 0,9562 x + 0,1087 \quad (R2 = 0,9825)$$

APRESENTAÇÃO

- Kit para 100 determinações (10 x 2 ml) (Cód. 1705001).
- Kit para 200 determinações (10 x 4 ml) (Cód. 1705005).
- Kit para 320 determinações (8 x 8 ml) (Cód. 1705003).

REFERÊNCIA

- Quick, A.J. - "Fisiología y Patología de la Hemostasis"- Ed. El Ateneo, Buenos Aires (1952).
- Araldi, H.T. et al. - "Primer Reactivo Nacional Argentino de Referencia de Tromboplastina de Cerebro Humano" - Acta Bioquim.Clín. Latinoam. XVI/1:131 (1982).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 28: Normalización de la Vigilancia del Tratamiento Anticoagulante (oral) - Serv. Inf. Téc. N° 610:49-56 (1977).
- Comité de Expertos de la O.M.S. en Patrones Biológicos - Inf. N° 31: Requerimientos para Tromboplastinas y Plasmas usados en la terapia anticoagulante oral - Serv. Inf. Téc. N° 658:202-223 (1981).
- Suñer Casadevall, F. - "Nuevas Normas Internacionales para la Expresión del Tiempo de Quick"- Análisis Clínicos X/40:240-245 (1985).
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed., 2001.

SÍMBOLOS

Os seguintes símbolos são utilizados nos kits de reagentes para diagnóstico da Wiener lab.



Este produto preenche os requisitos da Diretiva Europeia 98/79 CE para dispositivos médicos de diagnóstico "in vitro"



Representante autorizado na Comunidade Europeia



Uso médico-diagnóstico "in vitro"



Conteúdo suficiente para <n> testes



Data de validade



Limite de temperatura (conservar a)



Não congelar



Risco biológico



Volume após a reconstituição



Conteúdo



Número de lote



Elaborado por:



Nocivo



Corrosivo / Caústico



Irritante



Consultar as instruções de uso



Calibrador



Controle



Controle Positivo



Controle Negativo



Número de catálogo



Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina