



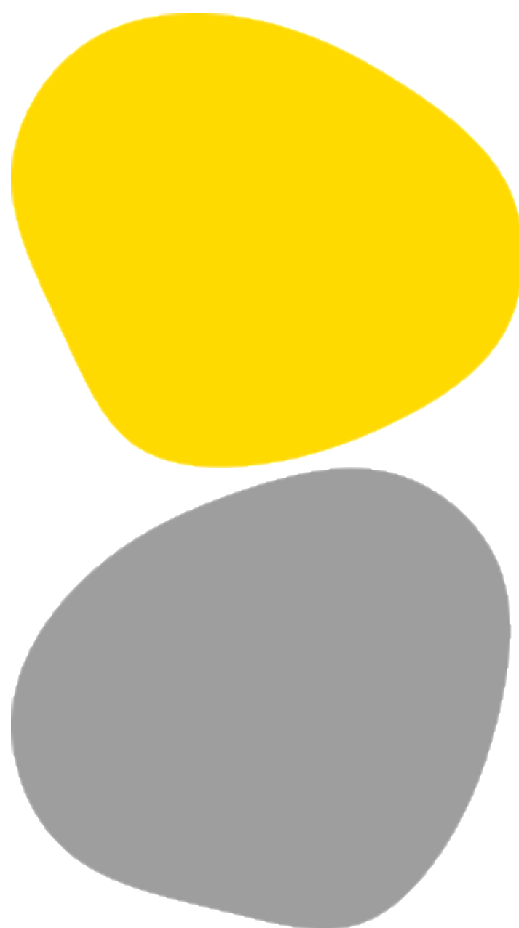
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA

Estudo laboratorial de componentes plasmáticos caninos: análise de parâmetros de coagulação

Paula Marisa Sousa Barbosa

06/2025





NIV – Núcleo de Investigação Veterinária
Rua Dr. Eduardo Santos Silva, 261/AH
4200-283 Porto

Estudo laboratorial de componentes plasmáticos caninos: análise de parâmetros de coagulação

Autor

Paula Marisa Sousa Barbosa

Orientadores

Especialista em ACSP/ Maria Manuela Amorim / Professora Coordenadora ATC-ACSP E2S e LAQV

REQUIMTE

Especialista ACSP/ Stéphanie Lopes Ferreira / Professora Adjunta ATC-ACSP E2S

*Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à
obtenção do grau de **Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo
de Imunohemoterapia e Transplantação** pela Escola Superior de Saúde do
Instituto Politécnico do Porto.*

Agradecimentos

A conclusão desta tese representa o culminar de um percurso que não teria sido possível sem o apoio, a orientação e o incentivo de várias pessoas e instituições, às quais quero expressar o meu mais sincero agradecimento.

Em primeiro lugar, agradeço profundamente às minhas orientadoras, Professora Maria Manuela Amorim Silva e Sousa e Professora Stephanie Lopes Ferreira, pelo acompanhamento atento, pela disponibilidade constante e pelas valiosas contribuições científicas e humanas que enriqueceram todo este trabalho. A vossa orientação foi fundamental para o desenvolvimento desta investigação e para o meu crescimento académico e profissional.

Agradeço igualmente ao Banco de Sangue Animal/Núcleo de Investigação Veterinária, pela oportunidade de realizar este estudo no seu contexto, bem como pelo apoio logístico e institucional que tornaram possível a concretização deste projeto.

Quero ainda deixar um especial agradecimento aos meus pais, Ana e Paulo, pelo amor incondicional, pelo apoio contínuo e por tudo o que sempre fizeram por mim. Ao meu marido, Miguel, agradeço do fundo do coração pela paciência, pela compreensão e pelo incentivo constante ao longo de todo este percurso. O vosso apoio foi essencial em todos os momentos, especialmente nos mais desafiantes.

Agradeço também aos meus colegas de trabalho, não só pelo companheirismo e encorajamento, mas também pela ajuda concreta que me deram ao longo do desenvolvimento deste estudo, com contributos, partilhas e disponibilidade.

Aos meus amigos, um agradecimento sincero pela amizade, pelo apoio emocional e por estarem sempre presentes ao longo desta jornada. A vossa presença foi, sem dúvida, uma fonte constante de motivação e equilíbrio.

Resumo

A crescente relevância da transfusão sanguínea na prática veterinária tem impulsionado o desenvolvimento e a otimização de metodologias laboratoriais voltadas para a produção de componentes específicos do sangue, como o crioprecipitado (CP) e o criosobrenadante (CS).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a eficácia de um protocolo ajustado para o processamento de crioprecipitados caninos, com base na análise de parâmetros hemostáticos em três tipos de frações plasmáticas: plasma fresco congelado, CP e CS.

Foram analisadas 90 amostras obtidas de 30 cães dadores clinicamente saudáveis, recolhidas e processadas entre outubro de 2024 e fevereiro de 2025. A investigação centrou-se na quantificação dos fatores de coagulação I, V, VII, VIII e IX, assim como na determinação dos tempos de protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (aPTT). A análise estatística foi conduzida com recurso a testes *t de Student* ou de *Wilcoxon*, conforme a distribuição dos dados, tendo sido considerado um nível de significância de 0,05.

Os dados revelaram uma concentração significativamente mais elevada de fibrinogénio no CP ($p < 0,001$), indicando uma recuperação eficiente deste fator. No entanto, observou-se também valores elevados dos fatores V, VII e IX neste mesmo componente, o que contraria o que é tradicionalmente descrito na literatura científica. Já o fator VIII não apresentou variações estatisticamente relevantes entre os diferentes componentes analisados.

Estes resultados sugerem possíveis limitações no protocolo implementado, nomeadamente associadas ao descongelamento do plasma à temperatura ambiente, à ausência de uma etapa de centrifugação subsequente e a utilização de reagentes concebidos para matriz humana, cuja adequação a amostras de origem canina poderá ser questionável.

Concluimos que os dados obtidos indicam que o protocolo testado não permite uma separação eficaz e seletiva dos fatores de coagulação desejados, comprometendo a qualidade funcional do CP produzido. Assim, torna-se imprescindível ajustar os procedimentos técnicos às normas reconhecidas para a produção de componentes plasmáticos de uso veterinário, nomeadamente assegurando o controlo preciso da temperatura, a realização de centrifugação adequada e a utilização de reagentes validados para a espécie animal em questão.

Palavras-chave: Componentes plasmáticos caninos, crioprecipitado, fatores da coagulação, processamento, controlo de qualidade

Abstract

The increasing importance of blood transfusion in veterinary practice has led to the development and optimisation of laboratory methodologies for the production of specific blood components, including cryoprecipitate (CP) and cryosobrenadant (CS).

In this context, the main objective of this study was to evaluate the effectiveness of an adjusted protocol for processing canine cryoprecipitate. This was based on the analysis of haemostatic parameters in three types of plasma fractions: fresh frozen plasma, CP and CS.

A total of 90 samples were obtained from 30 clinically healthy donor dogs, with collection and processing occurring between October 2024 and February 2025. These samples were then analysed. The research focused on the quantification of coagulation factors I, V, VII, VIII and IX, as well as the determination of prothrombin (PT) and activated partial thromboplastin (aPTT) times. Statistical analysis was conducted utilising Student's t-tests or Wilcoxon tests, depending on the distribution of the data, with a significance level of 0.05.

The data revealed a significantly higher concentration of fibrinogen in the CP ($p < 0.001$), indicating efficient recovery of this factor. However, high values of factors V, VII and IX were also observed in this same component, which goes against what is traditionally described in scientific literature. Factor VIII exhibited no statistically significant variations between the different components analysed.

These results suggest possible limitations in the protocol implemented, namely those associated with thawing the plasma at room temperature, the absence of a subsequent centrifugation step and the use of reagents designed for human matrix, whose suitability for samples of canine origin may be questionable.

It is concluded that the data obtained indicates that the protocol tested does not allow for effective and selective separation of the desired coagulation factors. This has the potential to compromise the functional quality of the CP produced. It is therefore essential to adjust the technical procedures to the recognised standards for the production of plasma components for veterinary use, in particular by ensuring precise temperature control, appropriate centrifugation and the use of reagents validated for the animal species in question.

Keywords: blood coagulation disorders, dogs, PFC, coagulation factors, cryoprecipitate, quality control

Índice

1. Introdução	1
1.1. Dádiva de Sangue Canina	2
1.2. Sistema de Colheita de Sangue Total Canino	3
1.3. Processamento de Sangue Total Canino	4
1.4. Componentes sanguíneos Caninos	6
1.5. Componentes Plasmáticos Caninos	8
1.6. Controlo de qualidade dos componentes sanguíneos	9
1.6.1. Concentrado de eritrócitos	10
1.6.2. Plaquetas Frescas	11
1.6.3. Plasma Fresco congelado	12
1.7. Estudo Imunológico e Diagnóstico de Doenças Infeciosas em Cães	13
1.7.1. Determinação do Antígeno Eritrocitário Canino	13
1.7.2. <i>Screening</i> de Doenças Infeciosas	14
1.8. Aplicações dos Crioprecipitados/Criosobrenadantes	15
2. Objetivos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1. Tipo de Estudo	17
3.2. Amostra	17
3.3. Procedimento	17
3.4. Tratamento e análise de dados	19
4. Resultados	21
4.1. Análise Inferencial	21
4.1.1. Fibrinogénio	22
4.1.2. Fator V	22
4.1.3. Fator VII	23
4.1.4. Fator VIII	24
4.1.5. Fator IX	24
5. Discussão	25
6. Conclusão	29
Referências Bibliográficas	30
ANEXOS	37

Índice de Figuras

Figura 1 Diagrama do sistema de sacos quádruplos	4
--	---

Índice de Tabelas

Tabela 2 – Força centrífuga relativa e tempos para obtenção de diferentes produtos sanguíneos.....	6
Tabela 3 – Análise descritiva proteínas plasmáticas e fatores de coagulação em PFC, CP e CS.....	21
Tabela 4 – Teste de Wilcoxon da variável fibrinogénio em CP e CS.....	22
Tabela 5 – Teste t de Student da variável FV em CP e CS	23
Tabela 6 – Teste de Wilcoxon da variável FVII em CP e CS	23
Tabela 7 – Teste t de Student da variável FVIII em CP e CS.....	24
Tabela 8 – Teste t de Student da variável FIX em CP e CS.....	24



Lista de Siglas e Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
CE	Concentrado de eritrócitos
CP	Crioprecipitado
CPD	Citrato-fosfato-dextrose
CS	Criosobrenadante
DEA	Antígeno eritrocitário canino (do inglês <i>Dog Erythrocyte Antigen</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIX	Fator IX
FV	Fator V
FVII	Fator VII
FVIII	Fator VIII
FvW	Fator de von Willebrand
qPCR	Reação da cadeia em polimerase em tempo real (do inglês <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
LR	Leucorredução
PFC	Plasma fresco congelado
PLT	Plaquetas
RBC	Eritrócitos (do inglês <i>Red Blood Cells</i>)
SAG-M	Solução aditiva salina composta por adenina, glicose e manitol
ST	Sangue Total
WBC	Leucócitos (do inglês <i>White Blood Cells</i>)

1. Introdução

Nos últimos anos, os animais de companhia têm despertado um interesse crescente na medicina veterinária, o que culmina num maior cuidado relativamente às suas necessidades de saúde e bem-estar (1). Essa mudança de paradigma tem impulsionado avanços significativos na medicina veterinária, com destaque para o ramo da medicina transfusional. Este campo tem adquirido cada vez mais relevância, especialmente no que diz respeito à administração seletiva de diferentes componentes sanguíneos. O aumento do foco nesta área da medicina transfusional veterinária reflete uma evolução ampla no tratamento e cuidado nos animais(2).

Nas últimas décadas, a medicina de transfusão veterinária tem sido alvo de elevado interesse, culminando no estabelecimento de Bancos de Sangue Animal como forma de atender à crescente procura por componentes sanguíneos veterinários de qualidade (3).

No cenário atual, é possível, a partir de sangue total, obter diversos produtos sanguíneos, incluindo concentrados de eritrócitos (CE), plasma fresco congelado (PFC), concentrado de plaquetas, crioprecipitado (CP) e criosobrenadante (CS). Esses produtos desempenham um papel crucial no suporte terapêutico de variadas condições clínicas em animais de companhia, como cães e gatos (4,5).

Dessa forma, surgiu a necessidade de expandir o conhecimento sobre os tipos sanguíneos, critérios de compatibilidade e protocolos padronizados, com o objetivo de minimizar os riscos associados a essa área da medicina transfusional. Paralelamente, a produção e utilização de componentes sanguíneos, como o CP, têm despertado interesse devido ao seu papel no tratamento de deficiências em fatores de coagulação (6).

O CP é um concentrado rico em fibrinogénio, fator VIII (FVIII) e fator de von Willebrand (FvW), amplamente utilizado na medicina humana e, mais recentemente, na veterinária. Apesar disso, há diferenças importantes entre os processos de obtenção, qualidade e eficácia do CP em cães. Essas diferenças refletem não só as características fisiológicas específicas de cada espécie, mas também os desafios técnicos associados ao processamento e armazenamento desses componentes sanguíneos (7).

Esta tese encontra-se organizada de forma a proporcionar uma visão sequencial e integrada do tema em estudo. Inicia-se com a descrição detalhada de todo o procedimento desde a dádiva de sangue canina até a obtenção de CP's, incluindo uma breve comparação entre os procedimentos aplicados em medicina humana e veterinária. Segue-se a apresentação da metodologia com ênfase nas etapas experimentais e no tratamento estatístico dos dados, os quais são posteriormente discutidos à luz da literatura científica

atual. Por fim, as conclusões sintetizam os principais contributos deste estudo e indicam perspetivas para futuros estudos.

1.1. Dádiva de Sangue Canina

A dádiva de sangue canina desempenha um papel crucial na medicina transfusional veterinária, sendo uma prática indispensável para o tratamento das mais diversas condições clínicas, como anemias, traumas e distúrbios na coagulação. De modo a garantir a segurança e eficácia desse procedimento, tanto para o dador como para o recetor, é essencial estabelecer critérios rigorosos de aceitação para os cães dadores (8).

Em primeiro lugar, os cães dadores devem cumprir determinados requisitos, nomeadamente, ter idade compreendida entre 1 e 8 anos de idade e apresentar peso mínimo de 22,7 kg (correspondente a 50lb, valor frequentemente referido na literatura). A idade mínima para um cão ser dador é de 12 meses, visto que durante os primeiros meses de vida, o sistema circulatório e imunológico do animal ainda não está completamente maduro, o que pode aumentar os riscos associados à colheita de sangue. (8,9).

Para garantir a elegibilidade de um cão como dador de sangue, além dos parâmetros anteriormente referidos, é essencial garantir que o nível de hemoglobina seja superior a 13g/dL, assegurando o não desenvolvimento de anemia em consequência da dádiva. Para além disso, o cão deve ser clinicamente saudável, ou seja, não apresentar sinais de doenças infecciosas, estar vacinado e desparasitado, não tomar qualquer medicação além dos desparasitantes, não ter histórico de doenças graves, não apresentar sopro cardíaco e nunca ter recebido transfusões (10).

Previamente à dádiva de sangue propriamente dita, procede-se à colheita de amostras para dois tubos principais: um tubo de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e um tubo sem anticoagulante. O tubo com EDTA é utilizado para a realização de testes de tipificação sanguínea, essenciais para garantir a compatibilidade transfusional e para análises hematológicas como hemograma completo. Por sua vez, o tubo sem anticoagulante é destinado a análises bioquímicas, incluindo a avaliação das funções hepática, renal e de eletrólitos. Além disso, também são realizados exames de *screening* de doenças, nomeadamente testes por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), a partir do tubo de EDTA, e serológicos através da amostra colhida no tubo sem anticoagulante, para descartar a presença de infeções transmissíveis como hemoparasitoses e doenças virais (11,12). No caso das fêmeas, não são elegíveis as que estejam gestantes ou lactantes, sendo preferível que se encontrem fora do ciclo reprodutivo ou já esterilizadas. Caso os anteriores critérios sejam cumpridos, procede-se à colheita de amostras de sangue para análise laboratorial e, de seguida, para a dádiva de ST(13,14).

O processo de triagem começa com uma entrevista detalhada realizada ao tutor do animal, na qual são questionados o histórico clínico, a vacinação e os tratamentos prévios. Em seguida, o médico veterinário responsável realiza um exame físico completo, avaliando a condição geral do cão e identificando possíveis contraindicações. Após concluir a etapa de triagem, o cão é submetido à colheita de sangue, que é realizada preferencialmente na veia jugular, por ser de fácil acesso e oferecer um maior fluxo sanguíneo e rapidez na dádiva (13,15).

A colheita de sangue é realizada sem sedação, o que reforça a importância de avaliar previamente o temperamento do animal. Cães dóceis e que toleram bem a manipulação são mais adequados para este procedimento, pois isso reduz o risco de complicações e garante a segurança quer do animal quer de toda a equipa envolvida no processo de dádivas. Além disso, a leitura do microchip de cada animal é efetuada no momento da dádiva, assegurando a identificação correta do dador. (13,16).

Em humanos, o volume de sangue colhido durante uma dádiva varia entre 10–15% do volume total de sangue do dador. Para um adulto médio de aproximadamente 50 kg, isso corresponde a uma dádiva de 450mL $\pm$ 10 %. Relativamente aos sinais vitais, a pressão arterial sistólica deve ser mantida acima de 75 mmHg, já que valores inferiores podem provocar uma reação sincopal, caracterizada por perda de consciência, com ou sem convulsões (17,18).

Apesar do peso ser inferior ao dos humanos, os cães apresentam uma maior tolerância a colheitas de sangue em volumes semelhantes. Um estudo realizado na Universidade de Ohio, nos Estados Unidos, avaliou as reações de 19 galgos com pesos variando entre 27 e 41 kg, após a dádiva de cerca de 450mL de sangue. Esse volume corresponde a aproximadamente 17–22% do volume total de sangue dos cães. Os resultados mostraram que, após a dádiva, a pressão sistólica dos animais apresentou uma variação não significativa, de 145 mmHg para 134 mmHg, sem resultar em quaisquer efeitos adversos relevantes (19).

1.2. Sistema de Colheita de Sangue Total Canino

A colheita de sangue canino envolve técnicas e equipamentos específicos que garantem tanto a segurança do dador quanto a qualidade do sangue colhido. Para este procedimento, recorre-se a um sistema fechado quadruplo de sacos (Figura 1) (20–22).

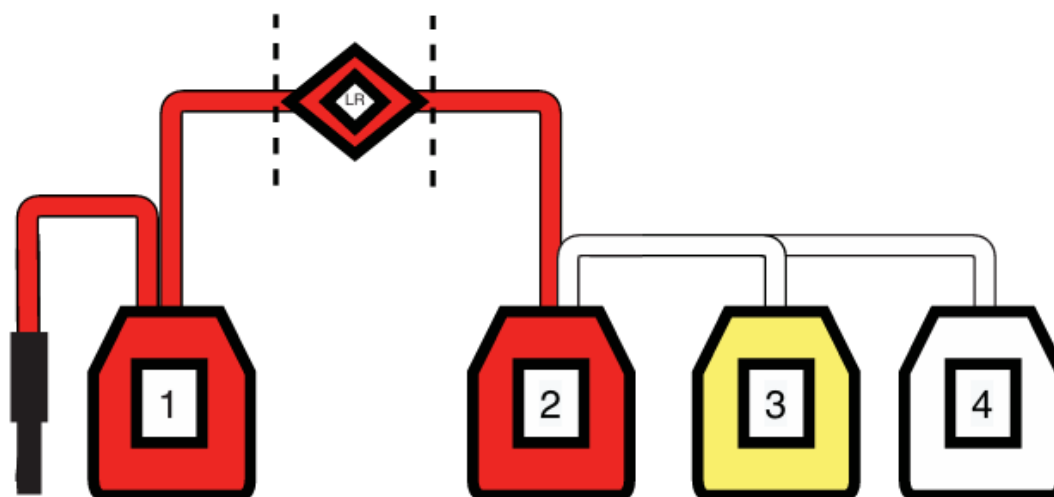


Figura 1 Diagrama do sistema de sacos quádruplos

1) Bolsa de colheita de ST 2) Saco de ST após passar ou não pelo filtro de leucorredução (LR). As linhas tracejadas representam os locais onde o filtro pode ser removido assepticamente e as tubuladoras podem ser unidas de forma asséptica. O saco 2 é centrifugado e retém a porção de eritrócitos concentradas na parte inferior e o PFC na parte superior. 3) Após a centrifugação, o PFC é expelido do saco 2 para o saco 3. 4) Para a preservação dos eritrócitos concentrados no saco 2, é adicionada uma solução preservante (saco 4) (21)

Este sistema, à semelhança do utilizado em humanos, inclui múltiplos sacos para o processamento de componentes em ambiente fechado, o que minimiza o risco de contaminação bacteriana, pois impede que o sangue seja exposto ao ambiente tanto durante a colheita como aquando do processamento (8,20).

Um dos sacos (1) é projetado para colher 450 ± 50 mL de sangue em 63 mL de solução anticoagulante à base de citrato-fosfato-dextrose (CPD) na proporção de 1:9. O CPD, apresenta uma validade de 21 dias sendo que, juntamente com a adição de uma solução aditiva salina composta por adenina, glicose e manitol (SAG-M) (4) permite prolongar a viabilidade dos eritrócitos até 42 dias (8,10,16,20,23).

1.3. Processamento de Sangue Total Canino

O ST deve ser processado, idealmente, dentro de 8 horas após a colheita, para garantir a máxima qualidade dos componentes produzidos. No entanto, nem sempre é possível realizar esse processamento de forma imediata. Nas situações em que esse intervalo de tempo colheita-processamento, não consiga ser assegurado, o sangue pode ser armazenado em diferentes temperaturas, dependendo do objetivo: para a obtenção de plaquetas (PLT), ele deve ser mantido à temperatura ambiente ($20-24^{\circ}\text{C}$), caso contrário, deve ser armazenado a 4°C . Com base no produto

desejado, a velocidade e a temperatura de centrifugação são ajustadas para otimizar o processamento (24,25).

As transfusões de produtos sanguíneos são amplamente utilizadas, mas não estão isentas de riscos. Até 2016, estimava-se que entre 3,3% e 28% dos cães submetidos a transfusões apresentavam reações transfusionais. Para minimizar essas reações adversas, mais de 20 países adotaram a LR, um processo que reduz significativamente a quantidade de leucócitos no sangue doado (10,21).

A presença de leucócitos no sangue está associada à liberação de citocinas durante o armazenamento, o que pode resultar em reações transfusionais. A LR, especialmente quando realizada antes do armazenamento, reduz significativamente a concentração dessas citocinas, diminuindo o risco de inflamação nos recetores. Embora não elimine completamente as reações adversas, esse processo aumenta consideravelmente a segurança das transfusões, sendo amplamente utilizado em bancos de sangue humano e gradualmente adotado nos bancos de sangue animal (26,27).

O processamento de unidades de sangue caninas apresenta diversas semelhanças com o processo realizado em humanos, sendo a área veterinária amplamente inspirada e adaptada dos procedimentos utilizados na medicina humana. Tal como nos humanos, o ST é colhido utilizando sistemas de colheita comercialmente preparados, através de um procedimento de venopunção asséptica (20).

Cada unidade contém aproximadamente 450-500mL de ST, com uma variação de até 10%, considerando o volume do anticoagulante presente no saco de colheita. O volume de sangue colhido é estimado com base no peso, sendo que a densidade específica do ST a 37°C é de 1,053 g/mL. O volume mínimo aceitável para colheita é de 300mL sendo que, nestes casos, o PFC é descartado, pois contém excesso de anticoagulante. Perante volumes inferiores, a unidade é totalmente descartada sendo considerada como uma dádiva de sangue sem aproveitamento (10,16).

Posteriormente à etapa da desleucocitação, a unidade de ST é sujeita a uma centrifugação de modo a obter os diferentes componentes sanguíneos: CE, plasma rico em plaquetas (PRP), concentrados de plaquetas, PFC, plasma congelado (PC), CP e CS (8,20).

O processamento do ST nos diferentes componentes pode ser realizada de várias formas, desde um processo maioritariamente manual após a centrifugação até a processos automatizados (8,14,24).

O processo manual para a separação do PFC do CE consiste no uso de um expressor de PFC que é composto por uma plataforma com uma mola que aplica uma pressão distribuída de forma igualitária sobre a unidade de ST após a centrifugação. Desta forma, a correta separação PFC/CE é da total responsabilidade do operador que consegue controlar este processo abrindo/fechando as tubuladoras (8,24).

Após a separação, procede-se à adição da solução nutritiva de SAG-M. Esta também pode ser adicionada manualmente e, para isso, quebra-se a válvula do saco da mesma e transfere-se para o CE garantindo uma mistura homogénea. Desta forma, obtém-se uma unidade de CE e uma unidade de PFC (8,14).

A evolução da automação resultou no desenvolvimento de dispositivos semiautomatizados de nova geração, como o CompoMat G5 (Fresenius Kabi), que promove uma maior padronização dos processos. Este dispositivo destaca-se por realizar todo o processo de separação de componentes sanguíneos de forma autónoma e eficaz. Este equipamento utiliza duas prensas que se movem de forma independente para transferir os diferentes componentes sanguíneos para os sacos satélite tendo também a capacidade de abrir automaticamente as cânulas do sistema CompoFlow (28,29).

1.4. Componentes sanguíneos Caninos

O ST, através de técnicas de processamento, pode ser separado em diferentes componentes sanguíneos, permitindo terapias mais específicas e eficazes. Os principais componentes sanguíneos incluem o CE, o PFC, PLT, CP e CS (30).

A obtenção de componentes sanguíneos caninos envolve processos de centrifugação adaptados, cada um ajustado conforme a necessidade de isolar os componentes específicos do sangue (Tabela 1) (24,31).

Tabela 1 – Condições de separação para obtenção de diferentes produtos sanguíneos a partir de ST

Produto inicial	Produtos finais	Configurações	Força centrífuga relativa (RCF) ¹ e Tempo
ST	RBC e PFC	Centrifugação forte, 4°C	5000g, 7 minutos
	RBC e PRP	Centrifugação suave, 20°C	2000g, 3 minutos
	<i>Buffy - coat</i> , PFC e RBC	Centrifugação forte, 20°C	5000g, 7 minutos
Plasma rico em plaquetas	PLT e PFC	Centrifugação forte, 20°C	5000g, 7 minutos
Camada leucoplaquetária	Plaquetas da camada leucoplaquetária	Centrifugação extra suave, 20°C	700g, 5 minutos

¹força aplicada ao produto sanguíneo durante a rotação num ponto específico no tempo e é diretamente influenciada pelo raio do rotor da centrífuga em uso.

PFC – plasma fresco congelado; PLT – plaquetas; PRP – plasma rico em plaquetas; RBC – eritrócitos.

O CE é obtido através da centrifugação a elevada RFC da unidade de ST, o que permite a separação eficaz dos eritrócitos. Esse componente possui uma alta concentração de eritrócitos, fundamentais para o transporte de oxigénio aos tecidos, sendo indicado principalmente no tratamento de anemias graves ou em situações de perda significativa de sangue. A vida útil destas células estende-se até 42 dias, desde que seja armazenado a temperaturas controladas entre 1°C e 6°C (20,32).

Em relação ao PFC, a sua classificação é geralmente dividida em duas categorias principais, consoante o intervalo de tempo entre a colheita e o processamento. O PFC é obtido quando a separação ocorre até 8 horas após a colheita do ST, sendo posteriormente congelado a uma temperatura igual ou inferior a -18°C, podendo ser armazenado nestas condições por um período máximo de 12 meses. Esse tipo de PFC é particularmente rico em fatores de coagulação e proteínas plasmáticas, como a albumina, sendo amplamente utilizado no tratamento de distúrbios hemorrágicos, como doenças hepáticas ou deficiência congénita ou adquirida de fatores de coagulação específicos (16,32,33).

Por sua vez, as PLT caninas podem ser obtidas através de dois métodos. No primeiro são isoladas através de um processo de centrifugação a uma velocidade inferior à aplicada para a obtenção dos eritrócitos e o PFC. Inicialmente, obtém-se o PRP, que pode ser submetido a uma segunda centrifugação, formando o concentrado de plaquetas. Este é especialmente importante para o tratamento de condições como trombocitopenia grave ou disfunção plaquetária, especialmente em contextos de hemorragia ativa. Para assegurar a viabilidade e funcionalidade das PLT, o concentrado de plaquetas deve ser armazenado à temperatura ambiente (entre 20°C e 24°C), sob agitação constante. A sua utilização é recomendada num intervalo máximo de 5 dias após a colheita, em virtude da rápida degradação funcional das PLT (32,34).

Adicionalmente, um método amplamente utilizado na Europa para a obtenção de PLT é o da camada leucocitária que envolve uma centrifugação inicial da unidade de ST. Nesse método, o PFC é retirado e a camada de células entre o PFC e o CE, rica em PLT, é isolada. Após essa separação, a camada é novamente submetida a uma centrifugação a fim de eliminar potenciais contaminações por eritrócitos, resultando num sobrenadante que corresponde ao concentrado de plaquetas. Comparando os dois métodos, o primeiro pode resultar numa ativação precoce das PLT, pelo que o método do BC apresenta mais vantagens, pois uma vez que as PLT são sujeitas a apenas uma centrifugação, a ativação das mesmas acaba por ser reduzida (31,35).

Sistematizando, cada componente sanguíneo canino tem processos específicos de preparação e armazenamento, que garantem a sua eficácia e aplicabilidade clínica, atendendo às diversas necessidades de tratamento de distúrbios sanguíneos e de coagulação (32).

1.5. Componentes Plasmáticos Caninos

O processamento do PFC é essencial na medicina veterinária, permitindo a criação de componentes sanguíneos que desempenham papéis críticos no tratamento de diversas condições clínicas, particularmente aquelas que envolvem problemas hemorrágicos, imunológicos ou metabólicos. A riqueza do PFC em proteínas e fatores de coagulação específicos possibilita a obtenção de derivados altamente eficazes e direcionados, como o CP e o CS, cujos usos terapêuticos são bem estabelecidos: o CP é indicado para o tratamento da hemofilia A, doença de von Willebrand e hipofibrinogenemia, enquanto o CS é utilizado em casos de hemofilia B, deficiências hereditárias dos fatores II, VII, X e XI, deficiência de vitamina K, hipoproteinemia e hipoglobulinemia (36).

Caso a unidade de ST seja processada após um intervalo de 8 horas ou quando o PFC ultrapassar um ano de armazenamento, considera-se PC. Embora o PC tenha uma redução nos níveis de alguns fatores de coagulação, como os lábeis, ele ainda é visto como uma valiosa fonte de albumina e imunoglobulinas, sendo indicado principalmente para o tratamento de hipoalbuminemia e para suporte imunológico. Ambos os tipos de plasma devem ser armazenados a temperaturas não superiores a -18°C para garantir a sua eficácia (37,38).

No contexto veterinário, estudos recentes indicam que a principal finalidade da administração de produtos plasmáticos é contornar distúrbios da coagulação, embora estejam documentados outros usos que incluem o aumento dos níveis de albumina em caninos doentes com hipoproteinemia e o fornecimento de imunoglobulinas (39–41).

O PFC quando processado adequadamente, pode ser utilizado para a produção de CP e CS, que possuem indicações específicas dependendo do tipo de condição clínica a ser tratada. A obtenção de CP e CS baseia-se no controlo preciso do descongelamento do PFC a temperaturas entre 1°C a 6°C , até que o PFC adquira uma consistência pastosa, com a presença de alguns cristais de gelo. Independentemente do método utilizado, a fase seguinte consiste numa centrifugação controlada, que permite a formação de um precipitado branco no PFC descongelado, rico em proteínas insolúveis a frio, nomeadamente, o FVIII, o FvW, o fibrinogénio e o fator XIII (FXIII). Embora a técnica básica permaneça a mesma, diferentes adaptações foram estudadas para otimizar a obtenção desses componentes, garantindo maior rendimento e qualidade no produto final (42,43).

Os métodos utilizados para obter CP têm tanto pontos em comum como diferenças na forma como são aplicados. O método de *Mason (Continuous-Thaw-Siphon)*, por exemplo, baseia-se no uso de um

banho-maria com temperatura mantida entre 4–6°C para permitir um descongelamento gradual, o que facilita a remoção do CS e melhora a concentração dos fatores desejados. Por outro lado, alguns estudos compararam o efeito do banho-maria e da refrigeração, concluindo que temperaturas mais elevadas preservam melhor o FVIII e o fibrinogénio, enquanto a refrigeração, por ser mais lenta, pode reter mais proteínas, mas com menor eficácia na separação do CP. O método aprimorado de *Thaw-Siphon* trouxe melhorias ao processo, ajustando o tempo de sifonagem e a disposição das bolsas, o que resultou numa melhor uniformidade na concentração dos fatores de coagulação. Apesar das diferenças entre os métodos, todos têm o mesmo objetivo de maximizar o rendimento e a qualidade do CP (44–47).

Após a remoção do CP do PFC previamente congelado e descongelado, obtém-se o CS. Este produto apresenta uma deficiência significativa de FVIII, FXIII, fibrinogénio e FvW mas retém a albumina e pode ser utilizado como fonte de fatores de coagulação dependentes da vitamina K (fatores II, VII, IX, X) (36,48).

O principal objetivo é obter um produto final com elevada concentração de fatores de coagulação essenciais no tratamento de distúrbios hemorrágicos. De salientar que todo esse processo requer um controlo rigoroso das condições de armazenamento, que devem permanecer inferiores a –18°C de modo a assegurar a qualidade e a eficácia dos componente sanguíneos até à sua utilização (49).

1.6. Controlo de qualidade dos componentes sanguíneos

Com a terapia com componentes sanguíneos a tornar-se um padrão na medicina transfusional em todo o mundo, a garantia da segurança dos componentes sanguíneos é fundamental e deve ser uma prioridade para os bancos de sangue. Para isso, é essencial avaliar a presença de doenças infecciosas no animal dador e realizar a tipificação sanguínea, garantindo maior compatibilidade na transfusão. Além disso, no momento da transfusão, testes de *crossmatching* são realizados para reforçar a segurança do procedimento (50).

A garantia da qualidade foi desenvolvida para monitorizar variações nos processos de fabricação e na qualidade dos produtos, assegurando que se cumprem os critérios estabelecidos nas etapas de produção. A importância da qualidade no sistema de transfusão é evidenciada nos padrões da *American Association of Blood Banks* e da Sociedade Italiana de Medicina Transfusional e Imuno-hematologia. Além disso, a implementação de um programa de garantia da qualidade é obrigatória e regulamentada pelas atuais Boas Práticas de Fabricação da *Food and Drug Administration* nos Estados Unidos, e na Europa, pelas diretivas 2002/98/EC e 2005/62/EC do Parlamento Europeu, que devem ser seguidas

por todos os estados-membros. Esses regulamentos têm como objetivo uniformizar e aplicar as diretrizes gerais de qualidade da norma ISO 9001, estabelecida pela *International Organization for Standardization*, ao contexto dos bancos de sangue, assegurando a eficácia e a segurança dos processos (51–54).

1.6.1. Concentrado de eritrócitos

O controlo de qualidade é essencial para garantir a segurança e eficácia dos componentes sanguíneos. Enquanto nas análises hematológicas e infecciosas se avalia a saúde e a condição física do dador, no processamento o controlo de qualidade tem como objetivo validar todos os processos envolvidos, assegurando que a unidade de eritrócitos se mantém íntegra e que todos os protocolos foram corretamente seguidos. Isto inclui, entre outros, a verificação dos cuidados no manuseamento das unidades, a proporção adequada de SAG-M e a garantia da esterilidade durante todo o processo. A realização deste controlo não só assegura a qualidade do produto final, mas também a segurança dos caninos doentes que irão receber o componente sanguíneo, tornando-se, assim, um passo fundamental para o sucesso da medicina transfusional (24,55).

O controlo de qualidade deste componente sanguíneo inicia-se com a realização do rastreio de doenças infecciosas, garantindo que o produto é mantido em quarentena até que todos os testes sejam concluídos e apresentem resultados negativos. Além disso, são implementados vários procedimentos adicionais de controlo de qualidade, tais como inspeção visual, medição da hemoglobina total e do sobrenadante, avaliação do hematócrito e da percentagem de hemólise. Tendo em conta o volume de amostras processadas por dia, estas medições são realizadas em 20% das unidades produzidas (56,57).

Para a recolha de amostras, as unidades de CE são suavemente homogeneizadas, garantindo uma amostra representativa dos componentes. Numa câmara de fluxo laminar classe II, colhe-se assepticamente uma alíquota de 3mL através de uma conexão estéril. Essa amostra é, então, analisada para determinar a hemoglobina total e o sobrenadante, bem como o hematócrito e a percentagem de hemólise.

O hematócrito é determinado através da centrifugação em micro hematócrito (Centrífuga de mesa de alta velocidade BKC–TH16B, BIOBASE GROUP Lu ICP, China) e a hemoglobina total é determinada com recurso a um analisador específico (Hb 201 System, HemoCue Inc., Califórnia, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. Após a centrifugação (Centrifuge IEC Centra CL3R, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA), a hemoglobina sobrenadante é analisada por espectrofotometria, utilizando um

equipamento concebido para a deteção de valores baixos de hemoglobina (Plasma Low Hb, HemoCue Inc., Califórnia, EUA), seguindo as instruções do fabricante (57).

A percentagem de hemólise é calculada através da seguinte fórmula (56):

$$\% \text{ de hemólise} = \text{Hemoglobina do sobrenadante (g/L)} \times (100 - \text{PCV}) / \text{Hemoglobina total (g/L)}.$$

Adicionalmente, é realizada uma cultura bacteriana para garantir a segurança do produto. Para isso, sob condições estéreis, adicionam-se 2,5mL de CE em frascos de cultura aeróbica que contém um meio de crescimento específico. Posteriormente, os frascos são colocados a incubar a 37°C e monitorizados continuamente durante um período de sete dias (24,58,59).

1.6.2. Plaquetas Frescas

As PLT desempenham um papel fundamental na hemostasia primária e, além da sua função hemostática, estão envolvidas em processos como angiogénese, reparação tecidual, inflamação e metastização. Além disso, são essenciais na preservação da integridade vascular em vasos sanguíneos. (34,60).

Devido à sua natureza biológica e ao curto tempo de conservação, as PLT representam um desafio particular no controlo de qualidade, uma vez que devem ser armazenadas entre 20 e 24°C, sob agitação constante, para manter a sua viabilidade funcional. Contudo, essas mesmas condições que preservam a sua eficácia também favorecem a proliferação bacteriana, tornando essencial um controlo rigoroso para garantir a segurança transfusional (34,61).

O controlo de qualidade das PLT envolve uma série de procedimentos laboratoriais para avaliar a sua concentração, esterilidade e *swirling*. Para tal, procede-se a uma agitação vigorosa do concentrado de plaquetas, garantindo a sua homogeneização. Em seguida, numa câmara de fluxo laminar, retira-se uma alíquota de 1mL para medição da concentração plaquetária num equipamento hematológico, permitindo a quantificação precisa (62).

Uma vez que as PLT são altamente propensas ao crescimento bacteriano, devido às condições ideais de temperatura em que são armazenadas, adicionam-se 2,5mL de concentrado de plaquetas em frascos de cultura aeróbica que contém um meio de crescimento específico que, posteriormente, são colocados a incubar a 37°C e monitorizados continuamente durante um período de sete dias. Estes testes asseguram que o componente sanguíneo está adequado para utilização clínica, minimizando riscos para os recetores. (63).

1.6.3. Plasma Fresco congelado

O controlo de qualidade do PFC é fundamental para garantir a segurança e eficácia dos componentes sanguíneos utilizados na transfusão. Este é um produto requerido em situações de reposição de proteínas hemostáticas em caninos doentes com deficiências hereditárias ou adquiridas de fatores e na reestruturação da integridade endotelial em condições de hemorragia grave ou aguda (38).

Durante o seu processamento efetua-se uma avaliação rigorosa de parâmetros que asseguram a sua qualidade, tal como a inspeção visual e a medição de proteínas totais, componentes celulares (leucócitos – WBC, RBC e PLT) e fatores de coagulação. A inspeção visual visa detetar possíveis alterações que possam comprometer a sua qualidade nomeadamente a evidência de hemólise e lipemia que podem comprometer a segurança da transfusão (24,64).

Relativamente às determinações laboratoriais, a medição das proteínas totais no PFC é uma das primeiras análises realizadas, uma vez que as proteínas, como o fibrinogénio e o FVIII, desempenham um papel crucial nas propriedades hemostáticas do PFC. O valor de referência para as proteínas totais no PFC está estipulado entre 6,0 g/dL e 8,6 g/dL em cães saudáveis sendo esta medição efetuada recorrendo-se a um refratómetro (10). Contudo, no local onde foi desenvolvida a presente investigação, o intervalo de referência foi ajustado para 3,6 g/dL a 7,7 g/dL, com base nas características específicas da população canina estudada.

Além disso, a medição de componentes celulares residuais, como RBC, WBC e PLT, deve ser realizada num contador hematológico. A presença excessiva de células sanguíneas no PFC pode ser um indicativo de contaminação ou de uma separação inadequada do sangue durante o processo do processamento. De acordo com os padrões de qualidade, os valores residuais de RBC devem ser inferiores a 1×10^6 células/ μ L, os WBC devem ser inferiores a 1×10^3 células/ μ L e as PLT não devem ultrapassar 10×10^3 células/ μ L. Valores elevados de células residuais podem interferir na eficácia do PFC e aumentar o risco de reações adversas (65).

Adicionalmente, é crucial monitorizar os fatores de coagulação mais lábeis presentes no PFC, como o fator V (FV) e o FVIII, já que estes são fundamentais para a coagulação sanguínea. O FVIII é particularmente importante para caninos com hemofilia e é um dos principais componentes terapêuticos do PFC. O FV, por sua vez, é essencial para a conversão de protrombina em trombina e, portanto, para a formação de coágulos. A medição desses fatores é necessária para garantir que o PFC mantém a sua capacidade de coagulação. A monitorização destes fatores é crucial, pois qualquer perda significativa de FVIII ou FV pode comprometer a eficácia do PFC em emergências, como em cirurgias ou em casos de trauma grave (24,38).

Estas medições e controlos são essenciais não só para garantir a qualidade do produto final, mas também para a segurança dos doentes que irão receber o PFC, prevenindo complicações derivadas de processos inadequados ou de PFC de baixa qualidade.

1.7. Estudo Imunológico e Diagnóstico de Doenças Infeciosas em Cães

As transfusões de sangue ou dos seus componentes são procedimentos que podem salvar vidas, mas nunca podem ser consideradas totalmente isentas de riscos. Um dos principais perigos é a ocorrência de incompatibilidades sanguíneas, que podem culminar em reações imunológicas graves como a hemólise ou o choque transfusional. Além disso, há o risco de transmissão de agentes infecciosos, como vírus, bactérias e hemoparasitas. Para minimizar esse risco, é fundamental que passem por uma triagem rigorosa para identificar possíveis agentes infecciosos (11,18).

1.7.1. Determinação do Antígeno Eritrocitário Canino

Em cães, tal como acontece nos humanos, a presença de glicolípidos e glicoproteínas na superfície dos eritrócitos permite a classificação em grupos sanguíneos. Na presença de um recetor/dador incompatível, esses antígenos podem desencadear uma reação que culmina na produção de anticorpos anti-eritrocitários circulantes (66,67).

Ao longo do tempo têm sido identificados diferentes grupos sanguíneos em cães. De forma rotineira, utiliza-se o acrónimo DEA (antígeno eritrocitário canino), seguido pela designação numérica do grupo sanguíneo classificado com aloanticorpos policlonais. Atualmente, são reconhecidos internacionalmente cinco tipos de DEA: DEA 1, 3, 4, 5 e 7. Os grupos sanguíneos caninos geralmente possuem dois alelos, um positivo e outro negativo, exceto o DEA 1, que anteriormente era dividido em DEA 1.1, DEA 1.2 e possivelmente DEA 1.3. No entanto, estudos recorrendo à citometria de fluxo revelaram que estes subtipos, na realidade, são variações de intensidade do tipo DEA 1. Os mesmos investigadores descobriram também um modo de hereditariedade autossómica dominante com pelo menos quatro alelos do DEA1, em que os alelos positivos (de forte a fraco) são dominantes sobre o alelo DEA 1 negativo. Por convenção, cada DEA é seguido por um número que começa com 1 para cada locus, seguido por um ponto e um número para o alelo no locus (12,68–70).

O grupo sanguíneo DEA 1 é extremamente antigénico e, por isso, considerado o com maior significado clínico em cães, similar ao sistema ABO em humanos. No entanto, contrariamente ao sistema ABO, no qual existem isohemaglutininas naturalmente recorrentes, não existe uma isohemaglutinina anti-DEA 1 natural em cães DEA 1 negativos (69).

Devido à sua imunogenicidade e prevalência, a tipificação sanguínea canina em Portugal é frequentemente realizada tendo em consideração apenas o DEA 1, já que é o mais relevante para a prática clínica, sendo responsável pela maioria das reações transfusionais.

A incidência do antígeno DEA 1 varia entre cães, dependendo da região geográfica e da raça. Um estudo realizado em Portugal permitiu concluir que a percentagem geral de cães DEA 1 positivos é de 56,9% e que todos os Boxers, Pastores Alemães e Dobermans são DEA 1 negativos enquanto que os São Bernardos são DEA 1 positivos (71).

A tipificação é realizada recorrendo ao tubo de EDTA. Este é armazenado a 4°C até ser utilizado para as análises. O método baseia-se na migração capilar dos eritrócitos com a ajuda de uma solução tampão numa tira teste que contém um anticorpo monoclonal específico para o antígeno DEA 1.1. 1. (72).

1.7.2. *Screening* de Doenças Infeciosas

De modo a garantir uma maior segurança nas transfusões, é estritamente necessário realizar o rastreio dos agentes infecciosos nos dadores. Existem diretrizes específicas projetadas para minimizar a possibilidade de transmissão de doenças por transfusões. Essas orientações sugerem a exclusão de agentes que se enquadrem em pelo menos um dos quatro seguintes critérios: 1 - o agente é comprovadamente responsável por causar doença clínica no recetor após a transfusão, 2 - o agente infeccioso pode estabelecer infeções subclínicas, transformando o dador num portador assintomático, 3 - é possível detetar o patogénico no sangue de animais infetados por meio de métodos laboratoriais, como cultura ou técnicas moleculares e 4 - a infeção resultante no recetor pode ser grave ou de difícil tratamento (11,73).

Atualmente, a *American College of Veterinary Internal Medicine* recomenda a triagem molecular e/ou serológica de patogénios em dadores caninos, incluindo *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Babesia canis*, *Babesia gibsoni*, outras espécies de *Babesia*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii* e *Leishmania donovani*. Também, dependendo da localização geográfica e da distribuição epidemiológica pode existir a necessidade de rastrear outros agentes infecciosos (11).

Os testes para agentes infecciosos não possuem 100% de sensibilidade e especificidade analítica ou clínica. Dessa forma, realizam-se testes tanto por biologia molecular como por serologia. O método de qPCR oferece uma alta sensibilidade e especificidade na identificação do ácido desoxirribonucleico (ADN) dos microrganismos causadores de doença o que permite detetar infeções em estádios iniciais, incluindo em animais assintomáticos garantindo a identificação precisa do agente infeccioso que esteja presente no sangue (11,74).

Complementarmente, o uso de serologia é importante pois deteta anticorpos produzidos pelo sistema imunológico em resposta à infeção, sendo útil para identificar exposições anteriores ou infeções crónicas que podem não apresentar carga viral suficiente para serem detetadas por qPCR. Esta complementaridade é relevante em infeções como a leishmaniose, que pode apresentar períodos de baixa parasitemia, e para a *Dirofilaria immitis*, que devido à sua natureza (forma adulta nos vasos sanguíneos) o qPCR pode não detetar. Relativamente à *Ehrlichia*, esta combinação de métodos aumenta a sensibilidade do diagnóstico (74–77).

Na realização de teste de PCR utiliza-se o sangue colhido em EDTA. As amostras são processadas de acordo com as instruções do fabricante dos kits moleculares. Após a extração, as amostras são submetidas a protocolos de amplificação específicos para cada agente em estudo.

Para os testes serológicos recorre-se a soro obtido de sangue colhido em tubos secos. Esta análise consiste em detetar a presença de anticorpos contra *Leishmania* spp. e *Ehrlichia* spp., indicando uma resposta imunológica do animal a essas infeções, enquanto para *D. immitis*, é investigada através da presença de antígenos circulantes, sugerindo a presença ativa do parasita. Tal como acontece no PCR, todos os testes possuem controlos positivos e negativos apropriados de modo a assegurar a validade e a precisão dos resultados (73).

Todos os dadores são testados para cada um destes agentes infecciosos em todas as dádivas de sangue. Animais com resultados positivos no qPCR e/ou nos testes serológicos são excluídos do programa de dadores.

1.8. Aplicações dos Crioprecipitados/Criosobrenadantes

Os CPs e os CSs desempenham um papel essencial na medicina transfusional veterinária, especialmente em cães com distúrbios de coagulação. O CP é indicado para o tratamento da doença de von Willebrand e da hemofilia A, uma vez que nem o FvW nem o FVIII estão disponíveis para uso veterinário na forma de concentrados. A administração pode ser feita de forma profilática antes de procedimentos invasivos ou em respostas a episódios hemorrágicos (7,38).

Comparativamente ao PFC, o CP permite a reposição destes fatores de coagulação com um volume significativamente menor, tornando-se a opção mais eficiente e segura para cães com estas coagulopatias hereditárias. Além disso, como contém elevadas concentrações de fibrinogénio, pode ser útil em casos de défice ou depleção deste fator, prevenindo ou minimizando hemorragias associadas(36,38).

Por outro lado, o CS, composto por albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação mais estáveis, é utilizado na reposição de proteínas plasmáticas em cães com hipoalbuminemia grave, doença hepática ou síndromes de perda proteica podendo também ser uma alternativa terapêutica em casos de défice de fatores de coagulação dependentes da vitamina K (36,38).

Ambos os componentes plasmáticos devem ser empregues com base nas necessidades do doente, garantindo uma abordagem transfusional mais precisa e reduzindo a exposição desnecessária a grandes volumes de PFC (38).

Neste estudo, pretendeu-se avaliar a viabilidade de um método alternativo, mais simples e com menos exigência técnica, para a obtenção de CP e CS. Em contraste com os protocolos convencionais – que recomendam o descongelamento controlado entre 1–6 °C seguido de centrifugação – optou-se por uma abordagem tradicional, com descongelamento à temperatura ambiente e sem centrifugação do CP, avaliando-se o impacto na qualidade dos componentes obtidos.

2. Objetivos

Este estudo tem como objetivo principal comparar os valores obtidos nos parâmetros analíticos da coagulação (tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada e os fatores I, V, VII, VIII e IX) em três produtos diferentes derivados de sangue caninos (PFC, CP e CS).

Como objetivos específicos, este estudo pretende:

- Verificar se o CP apresenta concentrações mais elevadas de fatores específicos (I, V, VII, VIII e IX), conforme esperado;
- Avaliar se o CS mantém níveis residuais esperados desses fatores;
- Inferir sobre a eficácia do protocolo de processamento do PFC na obtenção de CP e CS, tendo em conta a concentração dos fatores de coagulação.

Pretende-se, desta forma, contribuir para uma melhor caracterização laboratorial destes componentes plasmáticos e para a otimização dos protocolos de processamento de PFC e utilização em contexto clínico veterinário.

3. Materiais e Métodos

3.1. Tipo de Estudo

O presente estudo caracteriza-se como quasi-experimental. A investigação baseia-se na análise de amostras obtidas sob diferentes condições de processamento.

3.2. Amostra

A amostra deste estudo é composta por 90 derivados de sangue de dadores caninos: 30 unidades de PFC; 30 de CP; 30 de CS. No período compreendido entre outubro de 2024 e fevereiro de 2025, foram incluídos no estudo PFCs caninos com volume igual ou superior a 250mL – volume mínimo requerido para a obtenção dos componentes plasmáticos em análise.

A seleção das unidades foi determinada com base na disponibilidade de dádivas de ST que cumprissem dois critérios estabelecidos: um peso mínimo de 400g da unidade de ST e, subsequentemente, a obtenção de um volume de PFC igual ou superior a 250mL. Relativamente aos critérios de exclusão, foram descartadas as amostras que apresentavam volume inferior a 250ml e que evidenciavam sinais de lipemia ou hemólise, uma vez que estas condições podem interferir nos resultados da análise do perfil da coagulação, comprometendo a precisão dos dados obtidos. As variáveis incluídas no estudo encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2 – Variáveis incluídas no estudo

Variável	Tipo	Forma de Recolha	Equipamento	Metodologia	Valores de referência
Contagem RBC residual	Quantitativa contínua	Analisador hematológico	Sysmex XN-1000 VET (Sysmex)	Citometria de fluxo fluorescente	$< 0,01 \times 10^6 / \mu\text{L}^1$
Contagem WBC residual					$< 0,10 \times 10^3 / \mu\text{L}^1$
Contagem PLT residual					$< 50,00 \times 10^3 / \mu\text{L}^1$
Proteínas totais	Quantitativa contínua	Refratómetro	Refratometria manual	–	3,6 – 7,7 g/dL ²
FV	Quantitativa contínua	Teste de atividade	STA Compact Max (Diagnostica Stago)	Coagulometria com deteção mecânica	2
FVII					2
FVIII					2
FIX					2
Fibrinogénio					2
Tempo de Protrombina (PT)					2
Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (aPTT)					2
Grupo sanguíneo	Qualitativa Nominal	Teste de tipagem	Método específico para tipagem canina	Cromatografia	–
Idade	Quantitativa contínua	Registo Clínico	–	–	–
Peso					

¹Valores de referência determinados pelo local de realização do estudo de acordo com a população de dadores

²Valores de referência humanos

3.3. Procedimento

As unidades de ST (450 ± 50 mL) foram colhidas da veia jugular utilizando um sistema de sacos quadruplo contendo solução anticoagulante de CPD e solução preservante para os eritrócitos (SAG-M – CompoFlow® Flexible & Select, Fresenius Kabi). O sangue foi desleucocitado e, de seguida, centrifugado a $3488 \times g$ durante 17 minutos (*Heraeus cryofuge 5500i Centrifuge, Thermo Scientific*). O plasma sobrenadante foi transferido para um outro saco. Qualquer unidade de plasma com evidência de lipémia ou hemólise foi excluída.

As tubuladuras foram seladas utilizando um selador de tubos de qualidade médica (*CompoSeal Slim, Fresenius Kabi*) e, para cada PFC, foram retiradas 4 alíquotas rotuladas como PFC, com o número do dador e a data de colheita. Para efeitos de controlo de qualidade foram efetuadas medições de proteínas totais por refratometria e de valores residuais de RBC, WBC e PLT (*Sysmex XN-Vet, Sysmex Asia Pacific*). Estas foram armazenadas num congelador a -80°C .

Paralelamente, foi realizado um controlo de esterilidade de todas as unidades de PFC selecionadas tendo sido efetuada cultura microbiológica em frasco de hemocultura e incubada num equipamento de leitura contínua da fluorescência durante 7 dias (*Bact/Alert PF, Bioré, Marcy l'Etoile, França*).

Com o auxílio de uma conectora estéril (*CompoDock, Fresenius Kabi*), uniu-se um saco de transferência (Sacos Transferência *Fresenius Compoflex 1F 400ml, Fresenius Kabi*) à unidade de PFC seguindo-se o seu armazenamento em congelador a -80°C até ao momento da realização do CP.

O CP foi preparado através do descongelamento das unidades de PFC num frigorífico ($2-6^{\circ}\text{C}$) durante o dia, até que o PFC atingisse uma consistência pastosa e um volume aproximado de 50 ± 5 mL. Este produto foi deixado a descongelar a temperaturas de $18-22^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3^{\circ}\text{C}$) e, de seguida, foram recolhidas 4 alíquotas a partir da tubuladura da unidade devidamente identificadas e armazenadas a -80°C até a realização da análise de proteínas. Do CS foram retiradas o mesmo número de alíquotas e armazenadas nas mesmas condições que as anteriores.

Todas as unidades de ST e os componentes plasmáticos (PFC, CP, CS) foram pesados numa balança de precisão para determinar os volumes de cada um. Embora, na medicina transfusional humana, o volume do CP esteja compreendido entre 5-15mL, frequentemente administrado sob a forma de *pools* compostos por 4 a 6 dadores), no presente estudo, desenvolvido numa população canina específica, o intervalo de referência do volume do CP foi ajustado para 45-55mL. Esta adaptação deve-se às particularidades fisiológicas e terapêuticas da espécie em questão, permitindo a administração do concentrado de forma individualizada, sem necessidade de *pooling*.

Este procedimento foi necessário para garantir o cumprimento dos critérios de inclusão, que exigem valores mínimos adequados à produção dos componentes sanguíneos.

No caso do ST, apenas foram incluídas unidades com volumes entre 450–500mL, valor padrão para colheitas em cães dadores, com uma margem de variação de até 10% devido à presença de anticoagulante no saco de colheita. Para a produção de CP e CS, apenas as unidades de PFC com volume igual ou superior a 250mL foram incluídos no estudo. Os cálculos foram baseados na densidade do ST de 1,053 g/mL e dos componentes plasmáticos de aproximadamente 1,02 g/mL. O estudo do perfil da coagulação foi realizado recorrendo ao equipamento *Stago STA Compact Max*.

Relativamente à tipificação, a determinação do grupo sanguíneo foi realizada com os kits de teste Alvedia® LAB DEA 1.1 (*Alvedia®*, *Alice Veterinary Diagnostic*, França) conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Este teste imunocromatográfico deteta a presença do antígeno DEA 1.1 e, portanto, um resultado positivo é indicado por uma faixa vermelha na parte central da tira, alinhada com a marca “DEA 1.1” no kit. Este resultado só é válido quando a linha de controlo (identificada com a letra “C”) aparece, pois, serve para atestar que o teste foi realizado corretamente

Em cada dádiva as amostras de sangue foram testadas por qPCR (LightCycler 480II, Roche) para espécies de *Leishmania*, *Ehrlichia*, *Brucella*, *Babesia* e *Anaplasma*.

Na extração de ADN recorreu-se ao kit DNA/RNA Extraction/purification (MagaBio plus whole Blood Genomic DNA Purification Kit, Bioflux), seguindo rigorosamente os protocolos recomendados. A deteção dos agentes infecciosos foi realizada através de kits comerciais fornecidos pela EXOPOL S.L., seguindo as instruções do fabricante. Em cada teste foram incluídos controlos de qualidade comerciais positivos e negativos para garantir a validade técnica dos resultados.

Também foram realizados testes serológicos pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA; Stratec Biomedical – Gemini) para espécies de *Leishmania*, *Ehrlichia* e *Dirofilaria immitis*, seguindo rigorosamente as instruções do fabricante.

3.4. Tratamento e análise de dados

O tratamento dos dados iniciou-se com a organização sistemática dos resultados obtidos e a verificação da sua integridade seguindo-se da análise estatística descritiva e inferencial das variáveis em estudo.

As amostras de PFC foram incluídas nesta análise com o propósito de caracterizar a amostras de origem e, dessa forma, evidenciar a presença das proteínas plasmáticas e dos fatores de coagulação de

interesse, nomeadamente: fibrinogénio, FV, FVII, FVIII e fator IX (FIX). Esta foi crucial para assegurar que os produtos resultantes do processo de crioprecipitação derivaram efetivamente de um produto que continha os componentes alvo. Desta forma, a análise do PFC teve uma função descritiva e confirmatória, não sendo incluída nas comparações estatísticas principais.

De modo a avaliar de uma forma mais objetiva a eficácia do protocolo em análise, calculou-se a taxa de recuperação de cada parâmetro hemostático em estudo. Esta taxa corresponde à proporção do valor obtido nos componentes plasmáticos: CP e CS, relativamente ao valor presente no PFC, expressa em percentagem:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{\text{Valor no CP/CS}}{\text{Valor no PFC}} \right) \times 100$$

Importa salientar que taxa de recuperação dos fatores de coagulação é um parâmetro quantitativo essencial para avaliar a eficácia do protocolo de processamento do CP canino. Contudo, este indicador, por si só, não permite uma análise objetiva e abrangente da qualidade do produto final.

A análise inferencial teve como objetivo comparar os valores obtidos de CP e CS para cada um dos parâmetros em estudo: fibrinogénio, FV, FVII, FVIII e FIX, de modo a avaliar o comportamento dos fatores de coagulação ao longo do processo de crioprecipitação. O nível de significância adotado foi de 0,05 e todas as análises foram realizadas com recurso ao software IBM® SPSS® Statistics (versão 29.0.1).

Inicialmente, para cada uma da variável, foi avaliada a normalidade da distribuição através dos testes de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*. Quando a normalidade foi confirmada ($p > 0,05$), recorreu-se ao teste t de *Student* para amostras emparelhadas, adequado para comparar duas variáveis relacionadas. Nos casos em que a normalidade dos dados não foi verificada ($p < 0,05$), foi utilizado o teste de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas. Este é um teste não paramétrico que permite avaliar diferenças entre duas medições relacionadas sem assumir a normalidade dos dados.

Para a análise da relevância prática dos resultados, foi calculado o tamanho do efeito, utilizando-se r para o teste de *Wilcoxon* ou d de *Cohen*, consoante o teste estatístico aplicado.

4. Resultados

Nesta seção são apresentados os principais resultados obtidos a partir da análise laboratorial das amostras de PFC, CP e CS. A análise descritiva da amostra inclui medidas de tendência central e de dispersão, como média (M) e desvio padrão (DP) (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise descritiva das proteínas plasmáticas e dos fatores de coagulação nos três produtos analisados: PFC, CP e CS

Parâmetros analíticos	Componentes Plasmáticos		
	PFC (M ± DP)	CP (M ± DP)	CS (M ± DP)
Fibrinogénio (mg/dL)	276,97 ± 117,32	460,13 ± 224,53	250,49 ± 102,34
FV (seg)	15,61 ± 1,35	17,25 ± 1,58	15,63 ± 0,88
FVII (seg)	22,53 ± 3,39	25,30 ± 3,51	21,48 ± 2,70
FVIII (seg)	32,87 ± 3,23	32,82 ± 5,34	34,79 ± 3,80
FIX (seg)	39,25 ± 4,15	42,11 ± 4,90	36,99 ± 3,52

A análise a taxa de recuperação de cada parâmetro da coagulação (Tabela 4) permitiu avaliar a eficácia do protocolo de separação adotado.

Tabela 4 – Taxa de Recuperação (%) dos Parâmetros Analíticos em CP e CS (relativamente ao PFC)

Parâmetros analíticos	Recuperação no CP (%)	Recuperação no CS (%)
Fibrinogénio (mg/dL)	166,15	90,45
FV (seg)	110,50	100,13
FVII (seg)	112,29	95,34
FVIII (seg)	99,85	105,84
FIX (seg)	107,29	94,23

Os resultados obtidos relativamente ao fibrinogénio indicaram uma recuperação significativamente elevada no CP (166,15%) quando comparado com o CS (90,45%), o que vai de encontro ao esperado. Por outro lado, o FVIII, embora apresente uma recuperação superior a 99% no CP, este valor é bastante próximo do no CS (105,84%), o que indica uma diferença pouco notória.

O FV apresentou recuperação levemente superior no CP (110,50%) em relação ao CS (100,13%), enquanto os fatores VII e IX também evidenciaram taxas maiores no CP.

4.1. Análise Inferencial

4.1.1. Fibrinogénio

Relativamente à análise do fibrinogénio, os testes de normalidade apresentaram valores de significância inferiores a 0,05 ($p = 0,018$), indicando que os dados não seguem uma distribuição normal. Posto isso, optou-se pela utilização do teste de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Teste de Wilcoxon da variável fibrinogénio em CP e CS

Comparação	N (casos)	Posto médio	Soma dos postos
FIB_CS < FIB_CP	29	15,79	458,00
FIB_CS > FIB_CP	1	7,00	7,00
FIB_CS = FIB_CP	0	—	—

FIB_CS – concentração plasmática do fibrinogénio em criosobrenadante | FIB_CP – concentração plasmática do fibrinogénio em CP

Posto médio: média das posições (ranks) atribuídas aos valores de um grupo numa comparação não paramétrica

Soma dos postos: total dos ranks atribuídos a um grupo, usado para comparar distribuições entre grupos

Os resultados obtidos mostraram que, em 29 dos 30 casos, os valores de concentração plasmática do fibrinogénio no CS (FIB_CS) foram inferiores aos valores de concentração plasmática do fibrinogénio no CP (FIB_CP), verificando-se apenas um caso com uma tendência inversa. O teste estatístico apresentou um valor de Z de -4,638, indicando uma diferença significativa em relação à hipótese nula(H_0): Não existe diferença significativa entre as concentrações plasmáticas de fibrinogénio no CP (FIB_CP) e no CS (FIB_CS). O valor de p bilateral foi inferior a 0,001 ($p < 0,001$), reforçando a evidência de que o resultado é altamente significativo e improvável de ocorrer por acaso.

4.1.2. Fator V

Relativamente à análise do FV, os testes de normalidade foram aplicados sobre as medições dessa variável nos CP e CS, sendo priorizados os resultados do teste de *Shapiro-Wilk* uma vez que, além de se tratar de uma amostra de 30 observações, os valores de significância foram de 0,055 (atividade do FV no CP) e de 0,252 (atividade do FV no CS), ambos superiores ao nível de significância de 0,05. Assim, não se rejeita a hipótese nula de normalidade, podendo-se assumir que ambas as variáveis seguem uma distribuição aproximadamente normal.

Deste modo, optou-se pela aplicação do teste *T de Student* para amostras emparelhadas (Tabela 6).

Tabela 6 – Teste t de Student da variável FV em CP e CS

Comparação	M (M)	DP	Diferença média	t	p	IC 95% da diferença
FV_CP vs FV_CS	17,25 vs 15,63	1,58 vs 0,88	1,62	6,626	< 0,001	[1,12; 2,12]

FV_CP – atividade do FV (em segundos) no CP | FV_CS – atividade do FV (em segundos) no CS

Os resultados revelaram uma diferença significativa entre os dois momentos de avaliação, com valores superiores de FV em CP (M=17,25; DP=1,58). A diferença média foi de 1,62 unidades, sendo estatisticamente significativa ($t(29)=6,626$; $p<0,001$). O intervalo de confiança a 95% ([1,12; 2,12]) reforça a robustez do resultado, indicando que é improvável que essa diferença tenha ocorrido por acaso.

4.1.3. Fator VII

Após a verificação da normalidade dos dados através do teste de *Shapiro-Wilk*, constatou-se que a atividade do FVII no CP apresentou uma distribuição significativamente diferente da normalidade ($p=0,014$), ao contrário no CS, que não violou esse pressuposto ($p=0,589$). Com estes dados, optou-se pela utilização do teste de *Wilcoxon* para amostras emparelhadas.

Com o teste de *Wilcoxon* avaliou-se as diferenças entre os valores da atividade do FVII no CP e no CS. Os resultados indicaram uma diferença estatisticamente significativa entre os pares comparados ($Z=4,743$; $p<0,001$), com os valores de FVII no CP consistentemente superiores aos de FVII no CS tal como se observa na tabela 7

Tabela 7 – Teste de Wilcoxon para atividade do FVII em CP e CS

Comparação	N (casos)	Posto médio	Soma dos postos
FVII_CS < FVII_CP	29	15,83	459,00
FVII_CS > FVII_CP	1	7,00	7,00
FVII_CS = FVII_CP	0	—	—

FVII_CP – atividade do FVII (em segundos) no CP | FVII_CS – atividade do FVII (em segundos) no CS

Este padrão sugere uma redução dos valores de FVII no produto de CS em relação ao CP.

4.1.4. Fator VIII

Em ambos os testes (*Kolmogorov-Smirnov* *Shapiro-Wilk*) e para ambas as condições (atividade do FVIII no CP e no CS), os valores de significância ($p > 0,05$) indicam que não houve evidência estatística para rejeitar a hipótese nula de normalidade. Dessa forma, assumiu-se que os dados seguem uma distribuição normal em ambas as situações e foi considerado o uso de testes paramétricos para a comparação da atividade do FVIII no CP e CS, nomeadamente o teste T para amostras emparelhadas (Tabela 8).

Tabela 8 – Teste t de Student da variável FVIII em CP e CS

Comparação	M (M)	DP	Diferença média	t	p	IC 95% da diferença
FVIII_CP vs FVIII_CS	32,83 vs 34,79	5,34 vs 3,80	-1,96	-1,709	0,098	[-4,31; 0,39]

FVIII_CP – atividade do FVIII (em segundos) no CP | FVIII_CS – atividade do FVIII (em segundos) no CS

Embora o CS tenha apresentado uma média numericamente superior à do CP, esta diferença não foi suficiente para ser considerada estatisticamente significativa ao nível de significância convencional ($\alpha = 0,05$). De acordo com o d de Cohen ($d = 0,312$), a magnitude do efeito foi pequena pois a diferença entre os dois componentes, além de não significativa, demonstra uma baixa relevância prática.

4.1.5. Fator IX

Efetuuou-se a análise da normalidade para ambas as condições (atividade do FIX no CP e no CS) que apresentaram valores de significância superiores a 0,05 ($p > 0,05$), o que indica que não há evidências estatísticas para rejeitar a hipótese nula de normalidade. Deste modo, assume-se uma distribuição normal, justificando-se o uso do teste T de *Student* para amostras emparelhadas (Tabela 9).

Tabela 9 – Teste t de Student da atividade do FIX em CP e CS

Comparação	M	DP	Diferença média	t	p	IC 95% da diferença
FIX_CP vs FIX_CS	42,11 vs 36,99	4,90 vs 3,52	5,11	5,061	< 0,001	[3,05; 7,18]

FVIX_CP – atividade do FVIX (em segundos) no CP | FVIX_CS – atividade do FVIX (em segundos) no CS

Os resultados revelaram uma diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois produtos, com $t(29) = 5,061$ e $p < 0,001$. O intervalo de confiança de 95% para a diferença média situou-se entre 3,05 e 7,18, reforçando a significância da diferença observada.

5. Discussão

O protocolo adotado no presente estudo consistiu num protocolo simplificado para a obtenção de CP e CS, com o objetivo de avaliar se esta abordagem, mais simples e distinta dos protocolos descritos na literatura, poderia produzir componentes plasmáticos de qualidade. De um modo geral, procedeu-se ao descongelamento do PFC a temperatura ambiente, sem subsequente centrifugação do CP contrastando com os métodos atuais, que propõem o descongelamento controlado entre 1-6°C, seguido de uma centrifugação específica (5000g, 7 minutos a 4°C) para separar eficazmente o CP do CS(38,79).

Embora esta abordagem vise reduzir custos operacionais e tempo de processamento, os resultados sugerem que o protocolo poderá não garantir uma recuperação eficaz de todos os fatores de coagulação, especialmente dos mais sensíveis, no CP e CS. De acordo com a literatura, o CP deve apresentar elevadas concentrações de fibrinogénio e de FVIII, enquanto que o CS tende a conter mais quantidade de fatores como o V, VII e IX(32,78).

Relativamente à taxa de recuperação, apesar do protocolo ter sido eficaz na preservação dos fatores da coagulação, nomeadamente o fator lábil FVIII, verificou-se que a separação diferencial esperada entre o CP e o CS foi apenas parcialmente alcançada. O valor de fibrinogénio apresentou o comportamento esperado com uma recuperação marcadamente superior no CP, ao passo que os demais fatores mostraram uma distribuição mais homogênea entre os componentes plasmáticos.

No decorrer deste estudo, foi observado que apenas o fibrinogénio apresentou um comportamento compatível com o esperado segundo a literatura (80,81) replicando o padrão clássico descrito para proteínas de alto peso molecular que precipitam a baixas temperaturas. Em 29 dos 30 casos, os valores de CP foram superiores aos do CS, sendo a média no CP de 182,33 mg/dL, comparativamente a 122,76 mg/dL no CS. Esta diferença revelou-se estatisticamente significativa ($p < 0,001$), confirmando que o protocolo permitiu, nesta situação, uma recuperação eficaz deste componente no CP. Estes resultados estão em concordância com estudos prévios que demonstram que o CP retém elevadas concentrações de fibrinogénio, enquanto que o CS contém apenas quantidades residuais (80,81).

Em contrapartida, os resultados obtidos para os fatores V, VII, VIII e IX mostraram uma distribuição inversa. De acordo com Freedman & Rock (2010), é geralmente aceite que o CS contenha maiores concentrações de FV, FVII e FIX em comparação com o CP. No entanto, os valores obtidos contradizem essa tendência. Para o FV, por exemplo, a média observada foi de 17,25 segundos no CP e 15,63 segundos no CS, diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$), indicando uma maior retenção

no CP. De modo semelhante, o FVII, apresentou também níveis superiores no CP, contrariando o perfil habitual descrito na literatura(81,82).

Relativamente ao FVIII, que idealmente deveria concentrar-se no CP, apresentou uma média ligeiramente superior no CS face ao CP, mas sem significância estatística, o que sugere uma distribuição ineficaz deste fator. Por fim, o FIX, que se esperaria encontrar em maior proporção no CS, revelou uma média de 42,11 no CP e 36,99 no CS, o que contraria também a distribuição esperada(32,38,82).

Do ponto de vista clínico, estas discrepâncias na composição dos componentes plasmáticos têm implicações relevantes. A retenção inadvertida de FIX no CP pode alterar o perfil hemostático do produto, potenciando efeitos trombóticos ou desencadeando respostas imunológicas indesejáveis em doentes que não necessitem deste fator, nomeadamente cães com hemofilia A submetidos a transfusões repetidas de CP (40,42,44). Simultaneamente, a depleção relativa de FIX no CS compromete a sua utilidade em protocolos de reposição dirigida para hemofilia B, bem como em esquemas de transfusão massiva, nos quais a composição das unidades plasmáticas é essencial para uma abordagem transfusional sequencial e adaptada às necessidades hemostáticas do cão. (42,44). Tais discrepâncias influenciam a previsibilidade da resposta clínica e aumentam o risco de complicações trombóticas, hemorrágicas ou imunológicas (40,42,44).

Uma análise crítica das discrepâncias observadas aponta para múltiplos fatores contributivos, entre os quais se destacam as diferenças interespecies, a robustez do protocolo utilizado, mecanismos de degradação e adsorção proteica e limitações metodológicas dos ensaios laboratoriais.

No que diz respeito às diferenças interespecies, é de salientar que a larga maioria dos estudos disponíveis sobre a preparação de CP/CS baseiam-se em plasma humano, o que torna essencial considerar as características próprias do plasma canino. Estudos demonstram variações significativas nos níveis basais de fatores da coagulação entre raças de cão, por exemplo, os Greyhounds exibem menores concentrações de fibrinogénio, FX e FvW quando comparados com outras raças(83).

Relativamente aos parâmetros técnicos dos protocolos, destacam-se dois desvios importantes face às práticas recomendadas: a temperatura de descongelação e a ausência de centrifugação final. A literatura indica que o PFC deve ser descongelado lentamente entre 1-6º, de modo a permitir a precipitação de proteínas de alto peso molecular, nomeadamente fibrinogénio, FVIII, FvW e FXIII, formando um concentrado estável antes da centrifugação (79,84). No entanto, neste estudo optou-se por descongelar à temperatura ambiente (20–22 °C), o que poderá ter comprometido a formação eficaz do precipitado e, consequentemente, favorece a solubilização de complexos ricos em fibrinogénio, FVIII e FvW. Além disso, a ausência de centrifugação impede a sedimentação eficaz do precipitado residual,

permitindo que fatores solúveis permaneçam no CS e, por sua vez, para a sua menor concentração no CP (85,86). Acresce que temperaturas superiores a 6 °C intensificam a atividade proteolítica endógena, sobretudo da plasmina, conduzindo à degradação de fatores lábeis como o FVIII e o FIX. Fenómenos de adsorção proteica às superfícies plásticas, particularmente quando estas não são sujeitas a tratamento anti-fouling, podem ainda reduzir a atividade destes fatores(87,88). Por outro lado, a calibração dos ensaios laboratoriais com padrões desenvolvidos para PFC humano pode comprometer a precisão das medições realizadas em PFC canino. Quando se utilizam curvas-padrão não validadas especificamente para a espécie em estudo, há risco de subestimação ou sobrestimação dos valores reais, especialmente no caso de proteínas sensíveis como o FVIII e o FIX. Estudos comparativos demonstram que a discrepância entre padrões humanos e caninos pode ser substancial, interferindo na fiabilidade dos resultados (89–93). Além disso, a aplicação de controlos de qualidade de origem humana às amostras caninas levanta preocupações quanto à validade analítica dos dados. Esta abordagem pode introduzir viés sistemático nas análises, reforçando a importância da utilização de reagentes, curvas-padrão e controlos validados especificamente para o PFC da espécie avaliada.

Para além dos fatores já mencionados, é crucial considerar a variabilidade biológica e o tamanho da amostra. O estudo incluiu 30 cães de diferentes raças e idades, todos clinicamente saudáveis. No entanto, essa diversidade contribui para uma variabilidade significativa nos níveis basais dos fatores de coagulação, limitando a generalização dos resultados como, por exemplo, a variação interindividual entre cães saudáveis demonstrada pelo tempo protrombina, fibrinogénio, entre outros(94). Esta heterogeneidade, em apenas 30 animais, pode acabar por ocultar subtilmente pequenas variações. De modo a mitigar esta variabilidade, uma das sugestões para estudos futuros, seria recorrer à criação de “pools” de PFC.

Tendo em conta os resultados obtidos e as limitações identificadas, é fundamental uma otimização do protocolo. As medidas a adotar passariam por efetuar o descongelamento entre 1–6°C, ao longo de 8 a 12 horas. Posteriormente, deve seguir-se uma centrifugação, idealmente a 4°C, para separar eficazmente o precipitado proteico do sobrenadante (5,38,83).

No que respeita à quantificação dos fatores, os kits de dosagem devem ser validados com curvas-padrão obtidas a partir de PFC canino, garantindo que os resultados reflitam com precisão a realidade fisiológica da espécie. Finalmente, recomenda-se a utilização de amostras combinadas (“pooling”) em estudos subsequentes, reduzindo a variabilidade biológica individual e melhorando a robustez dos resultados.

Por fim, importa sublinhar que a inconsistência na composição dos componentes plasmáticos obtidos por métodos não padronizados compromete a possibilidade de aplicar protocolos transfusionais pré-definidos, reduzindo a previsibilidade da resposta clínica e dificultando a comparação de resultados terapêuticos entre instituições ou estudos. Neste sentido, a padronização metodológica e a validação rigorosa da composição do CP e CS obtidos a partir de plasma canino são pré-requisitos fundamentais para garantir a segurança, eficácia e racionalidade da prática transfusional em medicina veterinária.

6. Conclusão

O presente estudo revelou que as escolhas metodológicas adotadas comprometeram a eficácia na produção de crioprecipitados caninos. Procedimentos como o descongelamento à temperatura ambiente, a ausência de centrifugação após o descongelamento, o uso de reagentes calibrados para matriz humana e um reduzido n amostral limitaram significativamente a qualidade dos resultados obtidos.

Embora se tenha verificado uma concentração eficaz de fibrinogénio no crioprecipitado, os restantes fatores de coagulação — nomeadamente os fatores V, VII, VIII e IX — apresentaram distribuições inesperadas, mantendo-se em concentrações elevadas no CS ou evidenciando valores discordantes com os descritos na literatura especializada. Estas discrepâncias podem ser atribuídas a potenciais perdas por degradação térmica, à ausência de separação física eficiente ou à utilização de métodos analíticos não validados para a espécie canina.

Deste modo, torna-se evidente a necessidade de reformular o protocolo de obtenção de crioprecipitados, de forma a garantir a produção de componentes plasmáticos com eficácia hemostática comprovada em medicina veterinária. Entre as melhorias propostas incluem-se: o descongelamento controlado a temperaturas entre 1 e 6 °C, a inclusão de uma etapa de centrifugação pós-descongelação e a utilização de sistemas analíticos validados especificamente para plasma canino.

Para aprofundar estes resultados, propõe-se a realização de um estudo futuro com um desenho experimental ampliado, que inclua um maior número de amostras, comparações entre diferentes protocolos de descongelamento e centrifugação e a aplicação de métodos analíticos validados especificamente para o plasma canino. Este estudo deverá ainda explorar a estabilidade dos fatores de coagulação ao longo do tempo e após diferentes condições de armazenamento, de forma a estabelecer diretrizes robustas para a produção de crioprecipitados de elevada qualidade, com impacto direto na prática clínica veterinária e na investigação translacional.

Referências Bibliográficas

1. Edney ATB. Companion Animals and Human Health: An Overview. J R Soc Med. dezembro de 1995;88(12):704P-708P.
2. Callan M. Red Blood Cell Transfusion in the Dog and Cat. Em 2022. p. 908-13.
3. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking [Internet]. 1.^a ed. Wiley; 2016 [citado 4 de janeiro de 2025]. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>
4. Ettinger SJ, Feldman EC. Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat / Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000.
5. Hohenhaus AE. Chapter 24 - Blood Transfusion and Blood Substitutes. Em: DiBartola SP, editor. Fluid, Electrolyte, and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice (Fourth Edition) [Internet]. Saint Louis: W.B. Saunders; 2012. p. 585-604. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781437706543000317>
6. Chiamonte D. Blood-component therapy: selection, administration and monitoring. Clin Tech Small Anim Pract. maio de 2004;19(2):63-7.
7. Prittie J. The role of cryoprecipitate in human and canine transfusion medicine. J Vet Emerg Crit Care. março de 2021;31(2):204-14.
8. Lucas RL, Lentz KD, Hale AS. Collection and preparation of blood products. Clin Tech Small Anim Pract. maio de 2004;19(2):55-62.
9. Brooks MB, Harr KE, Seelig DM, Wardrop KJ, Weiss DJ, editores. Chapter 118 Hematology of Laboratory Animals. Em: Schalm's Veterinary Hematology [Internet]. Wiley; 2022. p. 1058-72. Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=57I8zQEACAAJ>
10. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Chapter 14: Canine Blood Collection. Em: Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking [Internet]. 1.^a ed. Wiley; 2016 [citado 11 de janeiro de 2025]. p. 199-211. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>
11. Wardrop KJ, Birkenheuer A, Blais MC, Callan MB, Kohn B, Lappin MR, et al. Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. J Vet Intern Med. janeiro de 2016;30(1):15-35.
12. Correia B, Magalhães A, Rocha L, Cardoso I, Ferreira RRF, Mesa-Sanchez I. Prevalence of subclinical infectious agents in a blood donor population tested on every donation. J Small Anim Pract. março de 2024;65(3):176-80.
13. Yagi K, Bean BL. Canine Donor Selection. Em: Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking [Internet]. 2016 [citado 11 de janeiro de 2025]. p. 187-98. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9781118933053.ch13>
14. Schneider A. Blood components. Collection, processing, and storage. Vet Clin North Am Small Anim Pract. novembro de 1995;25(6):1245-61.

15. Reece WO. 12 The Composition and Functions of Blood. Em: Dukes' Physiology of Domestic Animals. 13th ed. Newark: John Wiley & Sons, Incorporated; 2015. p. 114–36. (New York Academy of Sciences Series).
16. Brooks MB, Harr KE, Seelig DM, Wardrop KJ, Weiss DJ, editores. Chapter 98 Principles of Canine and Feline Blood Collection, Processing, and Storage. Em: Schalm's Veterinary Hematology [Internet]. Wiley; 2022. Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=57l8zQEACAAJ>
17. Fung MK, Grossman BJ, Hillyer CD, Westhoff CM. Chapter 5 – Allogeneic and Autologous Blood Donor Selection. Em: Technical manual. 18th ed. Bethesda, Md.: American Association of Blood Banks; 2014. p. 117–34.
18. Harmening D. Chapter 13 – Donor Screening and Component Preparation. Em: Modern blood banking & transfusion practices [6th ed]. 6th ed. Philadelphia: F.A. Davis; 2012. p. 289–330.
19. Couto CG, Iazbik MC. Effects of blood donation on arterial blood pressure in retired racing Greyhounds. J Vet Intern Med. dezembro de 2005;19(6):845–8.
20. Trent K. Transfusion Medicine: Component Therapy.
21. Trinder RD, Lo E, Humm KR. The effects of leukoreduction on canine blood unit weight and processing time. J Vet Emerg Crit Care. 1 de novembro de 2022;32(6):836–9.
22. Kabi F. Medical Devices: CompoFlow® Flexible & Select [Internet]. Disponível em: <https://www.fresenius-kabi.com/content/dam/fresenius-kabi/no/products/product-documents/compoFlow-flexible/CompoFlow%20Flexible,%20CompoFlow%20Select%20-%20Product%20Folder.pdf.coredownload.inline.pdf>
23. Högman CF, Akerblom O, Hedlund K, Rosén I, Wiklund L. Red cell suspensions in SAGM medium. Further experience of in vivo survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects. Vox Sang. 1983;45(3):217–23.
24. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Chapter 17 Blood Component Processing and Storage. Em: Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2016 [citado 4 de janeiro de 2025]. p. 237–55. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>
25. Van der Meer PF, de Korte D. The Effect of Holding Times of Whole Blood and Its Components During Processing on In Vitro and In Vivo Quality. Transfus Med Rev. 1 de janeiro de 2015;29(1):24–34.
26. McMichael MA, Smith SA, Galligan A, Swanson KS, Fan TM. Effect of leukoreduction on transfusion-induced inflammation in dogs. J Vet Intern Med. outubro de 2010;24(5):1131–7.
27. Bilgin YM, van de Watering LMG, Brand A. Clinical effects of leucoreduction of blood transfusions. Neth J Med. outubro de 2011;69(10):441–50.
28. Serrano K, Levin E, Culibrk B, Weiss S, Scammell K, Boecker WF, et al. Performance characteristics of a novel blood bag in-line closure device and subsequent product quality assessment. Transfusion (Paris). outubro de 2010;50(10):2240–8.

29. Bontekoe IJ, van der Meer PF, Mast G, de Korte D. Separation of centrifuged whole blood and pooled buffy coats using the new CompoMat G5: 3 years experience. *Vox Sang*. 2014;107(2):140–7.
30. Basu D, Kulkarni R. Overview of blood components and their preparation. *Indian J Anaesth*. setembro de 2014;58(5):529–37.
31. Roback JD, Banks AA of B. Technical Manual [Internet]. AABB; 2011. (Technical Manual of the American Assoc of Blood Banks). Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=zLrWXwAACAAJ>
32. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Chapter 2 Component Therapy. Em: *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking* [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2016 [citado 4 de janeiro de 2025]. p. 13–26. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>
33. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Chapter 3 Red Blood Cell Products. Em: *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking* [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2016 [citado 4 de janeiro de 2025]. p. 29–42. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>
34. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Chapter 5 Platelet Products. Em: *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking* [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2016 [citado 4 de janeiro de 2025]. p. 55–69. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>
35. Vassallo RR, Murphy S. A critical comparison of platelet preparation methods. *Curr Opin Hematol*. setembro de 2006;13(5):323–30.
36. Chapter 100 Transfusion of Plasma Products. Em: *Schalm's Veterinary Hematology* [Internet]. Wiley; 2022. Disponível em: <https://books.google.pt/books?id=57l8zQEACAAJ>
37. Urban R, Guillermo Couto C, Cristina Iazbik M. Evaluation of Hemostatic Activity of Canine Frozen Plasma for Transfusion by Thromboelastography. *J Vet Intern Med*. julho de 2013;27(4):964–9.
38. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Chapter 4 Plasma Products. Em: *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking* [Internet]. 1.ª ed. Wiley; 2016 [citado 4 de janeiro de 2025]. p. 43–54. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>
39. Snow SJ, Ari Jutkowitz L, Brown AJ. Trends in plasma transfusion at a veterinary teaching hospital: 308 patients (1996–1998 and 2006–2008). *J Vet Emerg Crit Care San Antonio Tex* 2001. agosto de 2010;20(4):441–5.
40. Ropski MK, Guillaumin J, Monnig AA, Townsend K, McLoughlin MA. Use of cryopoor plasma for albumin replacement and continuous antimicrobial infusion for treatment of septic peritonitis in a dog. *J Vet Emerg Crit Care San Antonio Tex* 2001. maio de 2017;27(3):348–56.
41. Logan JC, Callan MB, Drew K, Marryott K, Oakley DA, Jefferies L, et al. Clinical indications for use of fresh frozen plasma in dogs: 74 dogs (October through December 1999). *J Am Vet Med Assoc*. 1 de maio de 2001;218(9):1449–55.
42. Drinkhouse M, Brooks MB, Stefanovski D, Marryott K, Callan MB. Influence of canine donor plasma hemostatic protein concentration on quality of cryoprecipitate. *J Vet Intern Med*. janeiro de 2019;33(1):124–31.

43. Sparrow RL, Greening DW, Simpson RJ. A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;728:259–65.
44. Prowse CV, McGill A. Evaluation of the «Mason» (continuous-thaw-siphon) method for cryoprecipitate production. *Vox Sang*. 1979;37(4):235–43.
45. Swanson JA, Soland MA, Hammel SA, Juskewitch JE. Effect of Water Bath versus Refrigerator Thaw on Cryoprecipitate Fibrinogen and Factor VIII Content Using a Pre-Pooled Plasma Experimental Approach. *Transfus Med Hemotherapy*. 20 de julho de 2024;1–6.
46. Kang EP. An improved thaw-siphon method for the cryoprecipitate preparation. *Vox Sang*. 1980;38(3):172–7.
47. Mason EC. Thaw-siphon technique for production of cryoprecipitate concentrate of factor VIII. *Lancet Lond Engl*. 1 de julho de 1978;2(8079):15–7.
48. Roback JD, Caldwell S, Carson J, Davenport R, Drew MJ, Eder A, et al. Evidence-based practice guidelines for plasma transfusion. *Transfusion (Paris)*. junho de 2010;50(6):1227–39.
49. Elias Santo-Domingo N, Lewis DH. Indications for use and complications associated with canine plasma products in 170 patients. *J Vet Emerg Crit Care San Antonio Tex* 2001. março de 2021;31(2):263–8.
50. Blasi Brugué C, Ferreira RRF, Mesa Sanchez I, Graça RMC, Cardoso IM, de Matos AJF, et al. In vitro quality control analysis after processing and during storage of feline packed red blood cells units. *BMC Vet Res*. 27 de abril de 2018;14(1):141.
51. Acker JP, Marks DC, Sheffield WP. Quality Assessment of Established and Emerging Blood Components for Transfusion. *J Blood Transfus*. 2016;2016:4860284.
52. WI: ASQ Quality Press. ANSI/ISO/ASQ Q9000–2000 Series—Quality Management Standards. [Internet]. 2000. Disponível em: <https://asq.org/quality-resources/iso-9000>
53. European Commission. Commission Directive 2005/62/EC of 30 September 2005 implementing Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council as regards Community standards and specifications relating to a quality system for blood establishments (Text with EEA relevance) [Internet]. 2005. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2005/62/oj/eng>
54. European Commission. Directive 2002/98/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 setting standards of quality and safety for the collection, testing, processing, storage and distribution of human blood and blood components and amending Directive 2001/83/EC [Internet]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2002/98/oj/eng?eliuri=eli%3Adir%3A2002%3A98%3Aoj&locale=pt>
55. Zimmermann R, Heidenreich D, Weisbach V, Zingsem J, Neidhardt B, Eckstein R. In vitro quality control of red blood cell concentrates outdated in clinical practice. *Transfus Clin Biol J Soc Francaise Transfus Sang*. setembro de 2003;10(4):275–83.

56. Sowemimo-Coker SO. Red blood cell hemolysis during processing. *Transfus Med Rev.* janeiro de 2002;16(1):46–60.
57. Janatpour KA, Paglieroni TG, Crocker VL, DuBois DJ, Holland PV. Visual assessment of hemolysis in red blood cell units and segments can be deceptive. *Transfusion (Paris).* julho de 2004;44(7):984–9.
58. Cornish N, Kirkley BA, Easley KA, Washington JA. Reassessment of the incubation time in a controlled clinical comparison of the BacT/Alert aerobic FAN bottle and standard anaerobic bottle used aerobically for the detection of bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* setembro de 1998;32(1):1–7.
59. Bourbeau PP, Foltzer M. Routine incubation of BacT/ALERT FA and FN blood culture bottles for more than 3 days may not be necessary. *J Clin Microbiol.* maio de 2005;43(5):2506–9.
60. Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. *Clin Chem Lab Med.* 26 de novembro de 2019;57(12):1808–17.
61. Aubron C, Flint AWJ, Ozier Y, McQuilten Z. Platelet storage duration and its clinical and transfusion outcomes: a systematic review. *Crit Care Lond Engl.* 5 de agosto de 2018;22(1):185.
62. Singh RP, Marwaha N, Malhotra P, Dash S. Quality assessment of platelet concentrates prepared by platelet rich plasma-platelet concentrate, buffy coat poor-platelet concentrate (BC-PC) and apheresis-PC methods. *Asian J Transfus Sci.* julho de 2009;3(2):86–94.
63. Mohr H, Lambrecht B, Bayer A, Spengler HP, Nicol SB, Montag T, et al. Sterility testing of platelet concentrates prepared from deliberately infected blood donations. *Transfusion (Paris).* 1 de março de 2006;46(3):486–91.
64. Das SS, Biswas RN, Sardar TP, Safi M. An insight to the internal quality control of blood components separated using the latest whole blood collection and processing systems: Experience from a tertiary care hospital blood transfusion service in Eastern India. *Asian J Transfus Sci.* dezembro de 2022;16(2):194–200.
65. Brando B. Viable lymphocytes in fresh frozen plasma as a potential source of graft-versus-host disease: risks and solutions. *Blood Transfus Trasfus Sangu.* novembro de 2021;19(6):445–7.
66. Bowdler AJ, Bull RW, Dries C, Slating R, Swisher SN. Representation of the ABH blood group system in the dog. *Vox Sang.* março de 1973;24(3):228–35.
67. Hallde. A naturally occurring red-cell antigen-antibody system in Beagle dogs. *J Small Anim Pract.* agosto de 1970;11(8):543–51.
68. Mangiaterra S, Rossi G, Antognoni MT, Cerquetella M, Marchegiani A, Miglio A, et al. Canine Blood Group Prevalence and Geographical Distribution around the World: An Updated Systematic Review. *Animals.* 29 de janeiro de 2021;11(2):342.
69. Yagi K, Holowaychuk MK, editores. Chapter 9 Canine Recipient Screening. Em: *Manual of Veterinary Transfusion Medicine and Blood Banking [Internet]*. 1.^a ed. Wiley; 2016 [citado 4 de janeiro

de 2025]. p. 117–28. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118933053>

70. Polak K, Acierno MM, Raj K, Mizukami K, Siegel DL, Giger U. Dog erythrocyte antigen 1: mode of inheritance and initial characterization. *Vet Clin Pathol.* setembro de 2015;44(3):369–79.
71. Ferreira RRF, Gopegui RR, Matos AJF. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Vet Clin Pathol.* junho de 2011;40(2):198–201.
72. Alvedia [Internet]. Disponível em: <https://www.alvedia.com/>
73. Wardrop KJ, Lappin MR. Canine and Feline Blood Donor Screening for Infectious Disease.
74. Nury C, Blais M, Arsenault J. Risk of transmittable blood-borne pathogens in blood units from blood donor dogs in Canada. *J Vet Intern Med.* maio de 2021;35(3):1316–24.
75. Stegeman JR, Birkenheuer AJ, Kruger JM, Breitschwerdt EB. Transfusion-associated *Babesia gibsoni* infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1 de abril de 2003;222(7):959–63.
76. De Freitas E, Melo MN, Da Costa-Val AP, Michalick MSM. Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Vet Parasitol.* abril de 2006;137(1–2):159–67.
77. Herrin BH, Peregrine AS, Goring J, Beall MJ, Little SE. Canine infection with *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. in Canada, 2013–2014. *Parasit Vectors.* 19 de maio de 2017;10(1):244.
78. Drinkhouse M, Brooks MB, Stefanovski D, Marryott K, Callan MB. Influence of canine donor plasma hemostatic protein concentration on quality of cryoprecipitate. *J Vet Intern Med.* janeiro de 2019;33(1):124–31.
79. Sparrow RL, Greening DW, Simpson RJ. A protocol for the preparation of cryoprecipitate and cryodepleted plasma. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;728:259–65.
80. Callum JL, Karkouti K, Lin Y. Cryoprecipitate: The Current State of Knowledge. *Transfus Med Rev.* 1 de julho de 2009;23(3):177–88.
81. Freedman M, Rock G. Analysis of the products of cryoprecipitation: RiCoF is deficient in cryosupernatant plasma. *Transfus Apher Sci.* 1 de outubro de 2010;43(2):179–82.
82. Benjamin RJ, McLaughlin LS. Plasma components: properties, differences, and uses. *Transfusion (Paris).* 1 de maio de 2012;52(s1):9S–19S.
83. Walton JE, Hale AS, Brooks MB, Boag AK, Barnett W, Dean R. Coagulation factor and hemostatic protein content of canine plasma after storage of whole blood at ambient temperature. *J Vet Intern Med.* abril de 2014;28(2):571–5.
84. Omidkhoda A, Tabatabaei MR, Atarodi K, Karimi K, Froushani AR, Pourfathollah AA. A comparative study of the effects of temperature, time and factor VIII assay type on factor VIII activity in cryoprecipitate in Iran. *Blood Transfus Trasfus Sangu.* outubro de 2011;9(4):394–9.

85. Pashmakova MB, Barr JW, Bishop MA. Stability of hemostatic proteins in canine fresh-frozen plasma thawed with a modified commercial microwave warmer or warm water bath. *Am J Vet Res.* 2015;76(5):420–5.
86. Edwards TH, Meledeo MA, Peltier GC, Ruiz DD, Henderson AF, Travieso S, et al. Effects of refrigerated storage on hemostatic stability of four canine plasma products. *Am J Vet Res.* dezembro de 2020;81(12):964–72.
87. Nogami K, Shima M, Matsumoto T, Nishiya K, Takeyama M, Tatsumi K, et al. Mechanisms of Plasmin-Catalyzed Inactivation of the Factor VIII. *Blood.* 16 de novembro de 2005;106(11):1017–1017.
88. Rock GA, Cruickshank WH, Tackaberry ES, Ganz PR, Palmer DS. Stability of VIII:C in plasma: the dependence on protease activity and calcium. *Thromb Res.* 1 de março de 1983;29(5):521–35.
89. Mischke R. Optimization of coagulometric tests that incorporate human plasma for determination of coagulation factor activities in canine plasma. *Am J Vet Res.* abril de 2001;62(4):625–9.
90. Wilmot HV, Rakowski K, Gray E. The traceability of commercial plasma calibrators to the plasma International Standards for factor VIII and factor IX. *Int J Lab Hematol.* dezembro de 2020;42(6):810–8.
91. Bauer N, Eralp O, Moritz A. Reference Intervals and Method Optimization for Variables Reflecting Hypocoagulatory and Hypercoagulatory States in Dogs using the STA Compact® Automated Analyzer. *J Vet Diagn Invest.* 1 de novembro de 2009;21(6):803–14.
92. Mischke R, Diedrich M, Nolte I. Sensitivity of different prothrombin time assays to factor VII deficiency in canine plasma. *Vet J Lond Engl* 1997. julho de 2003;166(1):79–85.
93. Dengate AL, Morel-Kopp MC, Beatty JA, Barrs V, Braddock JA, Churcher RK, et al. Evaluation and modification of the overall hemostasis potential assay for use with canine plasma. *Am J Vet Res.* 2013;74(12):1493–8.
94. Wiinberg B, Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M, Rojkaer R, Johansson PI, Gade LP, et al. Study on biological variation of haemostatic parameters in clinically healthy dogs. *Vet J Lond Engl* 1997. julho de 2007;174(1):62–8.

ANEXOS

ANEXO I – Resultados laboratoriais dos cães incluídos no estudo

1. Estudo Hematológico

ID Animal	RBC (10 ⁶ /μL) (5.20-7.90)	Hb (g/dL) (12.00-19.20)	Ht (%) (35.00-52.00)	WBC (10 ³ /μL) (5.60-20.40)	PLT (10 ³ /μL) (108.00-562.00)
5383	7.65	17.60	50.80	7.66	335.00
31799	7.26	20.40	56.50	7.40	191.00
3324	6.23	15.10	45.40	7.39	104.00
32335	7.75	18.00	52.20	12.57	352.00
32334	7.45	17.70	50.40	14.67	258.00
19120	6.98	15.30	46.80	13.15	263.00
11366	6.80	15.00	48.30	11.27	397.00
10904	7.08	18.20	50.10	6.96	268.00
14512	6.87	17.70	49.70	5.64	283.00
25330	7.48	19.20	52.60	8.43	238.00
36170	7.03	16.10	47.90	14.61	296.00
34770	7.33	16.00	49.70	20.44	292.00
34772	6.57	15.70	45.70	15.90	276.00
34775	7.05	16.80	50.50	15.10	326.00
34781	6.12	14.20	43.30	17.63	239.00
34785	6.75	14.80	45.50	20.11	165.00
34787	7.47	18.30	52.40	12.57	167.00
34799	5.47	13.70	40.50	15.69	307.00
29162	6.65	17.00	48.70	12.99	414.00
30727	6.57	16.60	49.00	13.43	377.00
19174	6.82	16.70	47.10	12.03	262.00
30732	7.38	16.20	50.30	18.88	178.00
19544	6.73	16.50	46.80	8.41	244.00
35315	6.51	15.70	44.80	17.54	286.00
15916	7.06	14.50	47.00	15.90	430.00
19330	5.64	12.90	39.20	13.96	288.00
19333	5.90	13.40	40.70	15.93	143.00
31322	5.96	14.30	42.70	17.33	193.00
32564	5.62	12.50	35.90	20.30	476.00
31573	6.70	14.20	44.10	16.95	134.00

2. Estudo Bioquímico

ID Animal	Creatinina (mg/dL) (0.50-1.40)	Proteínas Totais (g/dL) (5.30-7.60)	Albumina (g/dL) (3.20-4.70)	ALT (U/L) (10.00- 94.00)	Fosfatase Alcalina (U/L) (0.00-90.00)	Glicose (mg/dL) 64.00-123.00)
5383	1.02	5.64	3.43	39.11	76.54	96.58
31799	1.41	5.57	3.66	52.41	35.12	53.73
3324	1.28	6.98	3.87	29.96	24.61	69.89
32335	0.72	7.34	3.78	18.84	40.02	59.76
32334	0.63	6.55	3.93	41.09	46.11	63.30
19120	0.68	7.69	3.98	40.29	79.08	66.66
11366	1.20	6.00	3.48	38.58	50.05	120.00
10904	1.16	5.89	3.85	94.13	41.48	76.46
14512	1.25	5.80	3.87	41.47	46.22	88.93
25330	1.17	6.77	3.78	26.80	33.80	49.07
36170	1.12	7.07	3.82	46.50	42.98	81.71
34770	1.02	7.62	3.49	30.45	90.99	64.99
34772	1.07	7.63	3.97	22.04	39.46	66.93
34775	0.88	7.58	3.74	61.90	76.10	70.88
34781	0.96	6.79	3.61	43.02	40.57	64.00
34785	1.05	7.48	3.34	24.00	64.98	71.04
34787	0.77	7.30	3.99	41.48	52.36	65.05
34799	1.12	7.60	3.25	17.40	35.05	69.83
29162	0.68	7.05	4.09	28.52	90.75	71.06
30727	1.02	7.01	3.54	26.40	54.19	70.26
19174	0.75	7.13	3.99	50.32	17.29	67.73
30732	0.76	7.15	3.71	33.97	56.30	63.96
19544	0.69	6.75	3.69	42.18	42.77	67.38
35315	0.65	7.48	3.72	34.86	31.69	69.07
15916	0.58	7.61	3.53	33.78	73.52	65.52
19330	1.08	6.07	3.97	90.92	76.93	69.52
19333	0.57	7.21	3.76	45.74	59.59	65.69
31322	0.61	7.13	3.70	43.41	24.54	66.63
32564	0.59	6.94	3.28	33.72	79.01	67.82
31573	0.62	6.88	3.55	46.60	55.29	70.40

3. Estudo Serológico

ID Animal	<i>Ehrlichia spp.</i>	<i>Leishmania spp.</i>	<i>Dirofilaria Immitis</i>
5383	Negativo	Negativo	Negativo
31799	Negativo	Negativo	Negativo
3324	Negativo	Negativo	Negativo
32335	Negativo	Negativo	Negativo
32334	Negativo	Negativo	Negativo
19120	Negativo	Negativo	Negativo
11366	Negativo	Negativo	Negativo
10904	Negativo	Negativo	Negativo
14512	Negativo	Negativo	Negativo
25330	Negativo	Negativo	Negativo
36170	Negativo	Negativo	Negativo
34770	Negativo	Negativo	Negativo
34772	Negativo	Negativo	Negativo
34775	Negativo	Negativo	Negativo
34781	Negativo	Negativo	Negativo
34785	Negativo	Negativo	Negativo
34787	Negativo	Negativo	Negativo
34799	Negativo	Negativo	Negativo
29162	Negativo	Negativo	Negativo
30727	Negativo	Negativo	Negativo
19174	Negativo	Negativo	Negativo
30732	Negativo	Negativo	Negativo
19544	Negativo	Negativo	Negativo
35315	Negativo	Negativo	Negativo
15916	Negativo	Negativo	Negativo
19330	Negativo	Negativo	Negativo
19333	Negativo	Negativo	Negativo
31322	Negativo	Negativo	Negativo
32564	Negativo	Negativo	Negativo
31573	Negativo	Negativo	Negativo

4. Biologia Molecular (qPCR)

ID Animal	<i>Ehrlichia spp.</i>	<i>Babesia spp.</i>	<i>Anaplasma spp.</i>	<i>Brucella spp.</i>	<i>Leishmania spp.</i>
5383	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31799	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3324	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32335	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32334	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19120	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11366	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
10904	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
14512	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
25330	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
36170	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34770	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34772	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34775	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34781	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34785	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34787	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
34799	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
29162	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30727	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19174	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
30732	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19544	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
35315	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
15916	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19330	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19333	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31322	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
32564	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
31573	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

C.K. PREST®
Determinação do tempo de cefalina-caulino (TCK)

C.K. PREST® (2)

- Dispositivo para cerca de 120 testes contendo:
 - 6 frascos de Reagente 1 (C.K. Prest® 5)
 - 6 frascos de Reagente 2 (Activator)

(REF 00598)

C.K. PREST® (5)

- Dispositivo para cerca de 300 testes contendo:
 - 6 frascos de Reagente 1 (C.K. Prest® 5)
 - 6 frascos de Reagente 2 (Activator)

(REF 00847)

IBD

Português

1/ FINALIDADE

Determinação do tempo de cefalina-caulino (TCK) segundo o método de Langdell et al. (1) e Larrieu M.-J., Weiland C. (3).

2/ INTERESSE CLÍNICO

- O tempo de cefalina-caulino permite estudar globalmente a actividade dos factores de coagulação da via endógena (factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II) e, bem como o fibrinogénio.
- Observa-se um prolongamento do TCK nos seguintes casos (7):
 - Deficiências congénitas
 - ◊ se o tempo de Quick estiver normal, deve-se procurar determinar um défice em:
 - factor VIII (STA® - Deficient VIII, REF 00725)
 - factor IX (STA® - Deficient IX, REF 00724)
 - factor XI (STA® - Deficient XI, REF 00723)
 - factor XII (STA® - Deficient XII, REF 00722)
 - ◊ se todos estes factores estiverem normais, procura-se um défice em quinínogénio de elevado peso molecular (factor Fitzgerald).
 - Anomalias ou défices adquiridos
 - ◊ afecções hepáticas
 - ◊ coagulopatias de consumo
 - ◊ anticoagulantes circulantes (ACC) (antiprotrombinase ou ACC dirigido contra um factor)
 - ◊ tratamento anticoagulante (heparina, antitrombina K)
 - ◊ tratamento por inibidores da trombina (ex. hirudina, argatroban...).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

Tempo de recalcificação plasmática em presença de cefalina (substituto plaquetário) e de caulino (activação estandarizada do factor XII). Deste modo, analisa-se a via intrínseca da coagulação (factores XII, XI, IX, VIII, X, V, II e I) à excepção das plaquetas.

4/ COMPOSIÇÃO

- Reagente 1:** cefalina (substituto plaquetário) preparado segundo Bell e Altou (2) a partir de tecido cerebral de coelho, liofilizado.

- Reagente 2:** activador, suspensão tampão de caulino a 5 mg/mL, frasco de 2 mL (REF 00598) ou de 5 mL (REF 00847).

O Reagente 2 contém água salina (pH 7,4) como conservante. Os reagentes contendo água salina devem ser eliminados com precaução. Se estas soluções se destinarem a ser eliminadas na canalização, é necessário misturá-las com água corrente em abundância, a fim de evitar a formação de azidas metálicas que, quando em grande concentração, podem provocar explosões.

Alguns dos reagentes desta lista contém produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação destes reagentes, são utilizados métodos validados para a detecção do antígeno HbS e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da ausência de agentes infecciosos. Assim, estes reagentes de origem biológica devem ser manipulados com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.

5/ PRECAUÇÕES

As embalagens intactas devem ser conservadas à temperatura de 2-8 °C. Exclusivamente destinado utilização para diagnóstico *in vitro*. Estes reagentes só podem ser utilizados por pessoal habilitado para o efeito, autorizado pelo laboratório. Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação dos resíduos deverá processar-se em cumprimento da regulamentação local em vigor.

6/ RECOLHA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A coleta deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasias.

- Coleta de sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue. Utilizar tubos de coleta em plástico ou em vidro silicificado.
- No controlo dos tratamentos com heparina é preferível utilizar tubos CTAD que permitem inibir a libertação plaquetária *in vitro* (6).
- Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g.
- Conservação do plasma: 4 horas a 20 ± 5 °C (9).
- Plasmas com heparina: 2 horas a 20 ± 5 °C (coleta em citrato) 4 horas a 20 ± 5 °C (coleta em CTAD).

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

- Preparação**
Após agitação, transvasar o conteúdo de um frasco de Reagente 2 (R2) para um frasco de Reagente 1 incluído na mesma embalagem. Deixar a solução estabilizar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C). Depois, homogeneizar antes de utilizar.

- Conservação**
Liofilizado: a 2-8 °C, até ao termo do prazo de validade indicado na embalagem.
Reconstituído: 2 dias a 20 ± 5 °C 7 dias a 2-8 °C. Não congelar.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- STA® - CaCl₂ 0,025 M** (REF 00367).
- Coag Control N + P** (REF 00621) ou **System Control N + P** (REF 00617): controlos normal e anormal.
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas (recipiente de banho-maria ou aparelho semi-automático, como o ST ar® pipetas...).

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

O tempo de cefalina-caulino do doente deve ser comparado com o do plasma testemunho. Este plasma testemunho é constituído por uma dezena de plasmas testados isoladamente ou em conjunto (ver o capítulo "1.1 Limites do método").

Num tubo de hemólise a 37 °C:	
• Plasma puro (testemunho, doente ou controlo)	0,1 mL
• Reagente 1 homogeneizado, antes da pipetagem	0,1 mL
• Mistura, incolor de forma exacta	3 min
• Sob controlo por cronómetro, adicionar o CaCl ₂ 0,025 M pré-incubado a 37 °C	0,1 mL
Misturar. Registrar o tempo de coagulação (segundos).	

10/ RESULTADOS

Registrar o tempo de coagulação do testemunho e dos plasmas testados. O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Verificar se os resultados obtidos para os controlos se situam dentro dos intervalos indicados na etiqueta que acompanha o dispositivo. Se estes resultados se situarem fora do intervalo estabelecido, verificar se o sistema se encontra em boas condições de funcionamento: condições operatórias, reagentes, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir os testes.

11/ LIMITES DO MÉTODO

- Respeitar rigorosamente o tempo de incubação de 3 minutos. Em certos casos especiais, este tempo pode ser prolongado (máximo de 10 minutos), desde que o testemunho e o plasma do doente recebam igual tratamento.
- O C.K. Prest® não é geralmente sensível às deficiências de pré-calceína. A literatura descreve que "os doentes deficientes homocigotos (em pré-calceína) não apresentam qualquer manifestação hemorrágica especial" (8).
- Para o plasma testemunho, utilizar plasmas humanos normais: plasmas recolhidos a partir de uma população constituída por homens e mulheres de 18 a 55 anos, de boa saúde, não submetidos a qualquer medicação, mesmo que aparentemente anódina e que dêem o seu sangue de forma espontânea.

- No controlo dos tratamentos com heparina, a libertação de factor 4 plaquetário (potencial inibidor da heparina, representa uma das principais causas de erro. Por isso:
 - recolher o sangue em tubo de plástico, vidro silicificado ou tubo CTAD - efectuar a centrifugação no prazo de uma hora, para as coletas efectuadas em citrato, e de 4 horas para as coletas realizadas em CTAD.

Qualquer que seja a natureza da heparina utilizada (heparina não fracionária ou de baixo peso molecular) e qualquer que seja a dose (curativa ou preventiva), é necessário proceder a contagens plaquetárias regulares antes e durante o tratamento, para detecção de uma eventual trombopenia induzida pela heparina (TH) (10). Esta trombopenia pode ser detectada por meio do dispositivo **Asserchrom® NPIA** (REF 00615) que permite detectar especificamente os anticorpos anti-heparina/factor 4 plaquetário presentes na grande maioria das TH. Uma quantificação da antitrombina pode, segundo o contexto, revelar-se útil.

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

Os valores normais variam em função das condições locais (tipo de população, etc.). Por esta razão, recomenda-se que seja cada laboratório a estabelecer os seus próprios valores. Consideram-se geralmente como normais os tempos de coagulação incluídos no intervalo: média ($\bar{X}$) ± 2 desvio padrão (S).

A título de exemplo, 50 plasmas humanos normais foram testados no ST ar®. O tempo médio obtido foi de 30,4 segundos, com um desvio tipo de 2,4 segundos.

O tempo de cefalina + activador (TCK) apresenta-se estatisticamente alongado nos indivíduos jovens. Inversamente, observam-se tempos mais curtos nas populações idosas (4).

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Estudos de reprodutibilidade intra e inter-teste foram realizados em diferentes plasmas com o reagente C.K. Prest®. Os resultados obtidos no ST ar® estão indicados no quadro seguinte:

Amostra	Reprodutibilidade intra-teste		Reprodutibilidade inter-teste	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
n	24	24	10	10
X (s)	32,2	50,1	32,6	46,6
DS (s)	0,44	0,85	0,66	1,38
CV (%)	1,4	1,7	2,0	3,0

BIBLIOGRAFIA

- LANGDELL R.D., WAGNER R.H., BRINKHOUTS K.M.: "Effect of antithrombotic factor on one-stage clotting tests". J. Lab. Clin. Med., **41**, 637-647, 1953.
- BELL W.N., ALTON H.G.: "A brain extract as a substitute for platelet suspensions in the thromboplastin generation test". Nature, **174**, 880-881, 1954.
- LARRIERUE M.J., WEILLAND C.: "Utilisation de la 'cephaline' dans les tests de coagulation". Nouv. Rev. Fr. Hématol., **12**, 2, 199-210, 1957.
- CAWKWELL R.D.: "Patient's age and the activated partial thromboplastin time test". Thromb. Haemostasias, **39**, 780-781, 1978.
- LEVIN HILLMAN C.R., LUSHER J.M.: "Determining the sensitivity of coagulation screening reagents: a simplified method". Lab. Med., **13**, 3, 162-165, 1982.
- CONTANT G., GOUAULT-HEILMANN M., MARTINOLI J.L.: "Heparin inactivation during blood storage: its prevention by blood collection in citric acid, theophylline, adenosine, dipyridamole - C.T.A.D. mixture". Thromb. Res., **31**, 365-374, 1983.
- SAMAMA M., CONARD J., HORELLOU M.H., LECOMPTTE T.: "Physiologie et exploration de l'hémostasie". Paris: Doin, 152-153, 1990.
- BORG J.Y.: "Déficits constitutionnels en facteur de la coagulation en dehors de l'hémophilie" in "Manuel d'hémostasie". J. Sampol, D. Arnoux, B. Boulière, Paris: Elsevier, 359-377, 1995.
- "Etude des différents paramètres intervenant dans les variables préanalytiques (revue de la littérature)". Sang Thromb. Vais., **10**, 5-18, 1998.
- BONEU B., POTRON G., GRIEUX P., NGUYEN P., AIACH M.: "Utilisation des héparines en pratique médicale courante". Sang Thromb. Vais., **12**, 12-25, 2000.

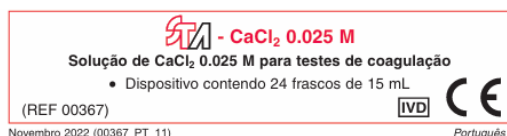
As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
Lattes, França
52020 Amboise sur Seine (France)
+33 (0)1 45 88 22 22
webmaster@stago.com

stago

As informações aqui contidas são apenas orientativas e não devem ser utilizadas para diagnóstico ou tratamento sem a supervisão de um médico. Os resultados de diagnóstico de Stago são marcas registradas. Portugal

Figura 2 - Bula CKPrest



1/ FINALIDADE

O STA® - CaCl₂ 0.025 M é uma solução aquosa de cloreto de cálcio utilizada para testes coagulométricos como o tempo de tromboplastina parcial ativado (aPTT) ou para testes de fatores da via intrínseca nos analisadores das famílias STA-R®, STA Compact®, STA Satellite® e ST art®.

2/ COMPOSIÇÃO

Cada embalagem de STA® - CaCl₂ 0.025 M contém uma etiqueta com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número do lote, referência do dispositivo, referência do reagente e prazo de validade.

STA® - CaCl₂ 0.025 M: solução de CaCl₂ 0.025 M.

Este reagente contém azida sódica (< 1 g/L) como conservante. Os reagentes contendo azida sódica devem ser eliminados com precaução. Se estas soluções se destinarem a ser eliminadas na canalização, é necessário misturá-las com água corrente em abundância, a fim de evitar a formação de azidas metálicas que, quando em grande concentração, podem provocar explosões.

3/ PRECAUÇÕES

A embalagem intacta deve ser conservada à temperatura de 2-8 °C. Exclusivamente destinado utilização para diagnóstico *in vitro*. Este reagente só pode ser utilizado por pessoal habilitado para o efeito, autorizado pelo laboratório.

Antes de utilizar ler atentamente o "Manual de Referência" relativo ao instrumento utilizado.

Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes.

A eliminação dos resíduos deverá processar-se em cumprimento da regulamentação local em vigor.

Para um utilizador na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/UE relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*): caso, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da respetiva utilização, ocorra um incidente grave, comunique o mesmo ao fabricante e à autoridade nacional.

4/ PREPARAÇÃO DO REAGENTE

Se o frasco for conservado a 2-8 °C, aguardar que estabilize à temperatura ambiente (18-25 °C), durante 30 minutos, antes de utilizar.

Ao utilizar este reagente nos aparelhos da linha STA®, não colocar o STA® - Reducer nem a cápsula de vedação.

5/ ESTABILIDADE E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

Quando conservado à temperatura de 2-8 °C em estado original, o reagente mantém-se estável até ao termo do prazo de validade indicado na embalagem.

Após a abertura, o reagente mantém-se estável durante:

– 24 horas a 37 °C

– 3 dias nos analisadores das famílias STA-R® e STA Compact®

– 6 dias nos analisadores da família STA Satellite®.

Em caso de utilização fracionada, a solução restante de STA® - CaCl₂ 0.025 M mantida a 2-8 °C no frasco de origem devidamente rolhado, conserva-se estável, desde que não contaminada, até ao termo do prazo de validade indicado no frasco.

6/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- Reagentes para a realização dos testes de coagulação.
- Analisadores das famílias STA-R®, STA Compact®, STA Satellite® ou ST art®.
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

7/ MODO DE UTILIZAÇÃO

- Com analisadores da família ST art®, consultar as instruções correspondentes aos testes a realizar.

- Com analisadores das famílias STA-R®, STA Compact® e STA Satellite®, após a abertura do frasco, introduzi-lo no equipamento como indicado no "Manual de Referência" relativo ao instrumento utilizado. O posicionamento do frasco deverá respeitar as seguintes instruções:
 - nos STA-R®, colocar o frasco na zona R2 da gaveta de produtos
 - nos STA Compact®, colocar o frasco na gaveta de produtos
 - nos STA Satellite®, colocar o frasco no carrinho de produtos.
 O equipamento utiliza automaticamente o STA® - CaCl₂ 0.025 M (ver o "Manual de Referência").

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
www.stago.com



As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos de propriedade intelectual. © 2022, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logótipos e/ou os nomes dos produtos de Diagnostica Stago são marcas registadas.

Figura 3 – Bula CaCl₂



SYSTEM CONTROL N + P

Plasmas de controlo para os testes de coagulação

- Kit contendo:
- 12 frascos de 1 mL de Reagente 1 (System Control N)
- 12 frascos de 1 mL de Reagente 2 (System Control P)

(REF 00617) IVD CE

Setembro 2022

Português

1/ FINALIDADE

O kit **System Control N + P** é constituído por um plasma normal e um plasma anormal, utilizados para o controlo de qualidade, na avaliação dos parâmetros da coagulação.

Os parâmetros abaixo indicados são determinados no Reagente 1 (System Control N):

- taxa de protrombina (TP): **Néoplastine® CI Plus** (REF 00375, 00376)
- tempo de cefalina + activador (TCA): **C.K. Prest®** (REF 00598, 00847), **PTT Automate®** (REF 00480) ou **STA® - Cephascreen®** (REF 00308, 00310)
- fibrinogénio (método de Clauss): **Fibri-Prest® Automate®** (REF 00613) ou **STA® - Liquid Fib** (REF 00673)
- tempo de trombina (TT): **STA® - Thrombin** (REF 00611, 00669)
- tempo de Reptilase®: **STA® - Reptilase®** (REF 00614)
- factor II: **STA® - Deficient II** (REF 00745) ou **STA® - ImmunoDef II** (REF 00740)
- factor V: **STA® - Deficient V** (REF 00744)
- factor VII: **STA® - Deficient VII** (REF 00743)
- factor VIII: **STA® - Deficient VIII** (REF 00725)
- factor IX: **STA® - Deficient IX** (REF 00724)
- factor X: **STA® - Deficient X** (REF 00738)
- factor XI: **STA® - Deficient XI** (REF 00723)
- factor XII: **STA® - Deficient XII** (REF 00722)
- antitrombina: **Liatest® AT III** (REF 00568)
- proteína C: **STA® - Staciot® Protein C** (REF 00747)
- proteína S: **STA® - Staciot® Protein S** (REF 00746).

Os mesmos parâmetros, à excepção dos tempos de trombina e de Reptilase®, são determinados no Reagente 2 (System Control P).

O TP e o TCA são testes globais de exploração da hemostase. O TT e o tempo de Reptilase® permitem explorar a fibrinólise. Os factores VII, XII, XI, IX, VIII, V, X, II e fibrinogénio estão implicados na coagulação propriamente dita. A antitrombina (AT), a proteína C e a proteína S são inibidores fisiológicos da coagulação.

2/ COMPOSIÇÃO

- **Reagente 1:** System Control N, plasma humano normal com citrato de liofilizado.
- **Reagente 2:** System Control P, plasma humano anormal com citrato de liofilizado.

Estes reagentes contêm produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação destes reagentes, são utilizados métodos validados para a detecção do antígeno HBs e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, estes reagentes de origem biológica devem ser manipulados com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.

3/ AVISOS E PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico *in vitro*. Estes reagentes só podem ser utilizados por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório. Manipular com as precauções de manuseamento os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação dos resíduos deverá processar-se em cumprimento da regulamentação local em vigor.

4/ PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Para cada um dos Reagentes 1 e 2, adicionar exactamente 1 mL de água destilada. Deixar a solução estabilizar, durante 30 minutos, à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, homogeneizar antes de utilizar.

5/ ESTABILIDADE DOS REAGENTES

- **Liofilizados:** a 2-8 °C, até ao prazo de validade indicado na embalagem.
- **Reconstituídos:** 4 horas a 20 ± 5 °C.

6/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- Reagentes que permitem a realização dos testes indicados no capítulo 1.
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

7/ MODO DE USAR

Utilizar os plasmas System Control N e P de forma idêntica à dos plasmas a testar.

8/ CARACTERÍSTICAS

A taxa dos diferentes parâmetros pode variar de um lote para outro, mas está indicada com precisão para cada lote. Ver a etiqueta incluída no dispositivo (os tempos de coagulação foram determinados nos aparelhos semi-automáticos ST art® de Diagnostica Stago).

As taxas de fibrinogénio, dos factores II, V, VII, VIII, IX, X, XI, de AT, de proteína C e de proteína S são determinadas com relação a padrões secundários das Normas Internacionais existentes, designadamente:

- 09/264 estabelecido em 2011 para o fibrinogénio
- 09/172 estabelecido em 2010 para os factores II, VII, IX, X
- 16/374 estabelecido em 2018 para o factor V
- 07/316 estabelecido em 2009 para o factor VIII
- 15/180 estabelecido em 2016 para o factor XI
- 08/258 estabelecido em 2010 para o AT
- 02/342 estabelecido em 2006 para a proteína C
- 03/228 estabelecido em 2006 para a proteína S.

9/ CONTROLO DE QUALIDADE

Na determinação dos diferentes parâmetros, verificar se os resultados obtidos para os Reagentes 1 e 2 se situam dentro dos intervalos indicados na etiqueta. Se estes resultados se situarem fora dos intervalos, verificar o funcionamento correcto dos testes: condições operatórias, reagentes, etc. Se necessário, repetir os testes.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
webmaster@stago.com



As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos de propriedade intelectual. © 2022, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logótipos e/ou os nomes dos produtos da Diagnostica Stago são marcas registadas.

Figura 4 – Bula System Control N + P

NeoPTimal
Determinação do tempo de protrombina (TP)

NeoPTimal 5

Kit conteúdo:

- 6 x 5 mL frascos de Reagente 1 (STA® - NeoPTimal 5)
- 6 x 5 mL frascos de Reagente 2 (Solvent)

(REF 01163)

NeoPTimal 10

Kit conteúdo:

- 12 x 10 mL frascos de Reagente 1 (STA® - NeoPTimal 10)
- 12 x 10 mL frascos de Reagente 2 (Solvent)

(REF 01164)

NeoPTimal 20

Kit conteúdo:

- 12 x 20 mL frascos de Reagente 1 (STA® - NeoPTimal 20)
- 12 x 20 mL frascos de Reagente 2 (Solvent)

(REF 01165)

0459

Portugal

Março 2023 (01163/01164/01165_PT_03)

1/ FINALIDADE

Os kits STA® - NeoPTimal fornecem reagentes de tromboelastina a partir de extrato de cérebro de coelho para a determinação quantitativa, em plasma humano citratado, do tempo de protrombina (TP) em os analisadores das famílias STA-R®, STA Compact® e STA Satellite®. O STA® - NeoPTimal é um teste de rastreio da coagulação destinado a ser utilizado pelos profissionais de laboratório no âmbito da avaliação da via extrínseca da coagulação e da monitorização da **terapia oral de antagonistas da vitamina K utilizando a Relação Internacional Normalizada (INR)**.

2/ RESUMO E EXPLICAÇÃO

O tempo de protrombina consiste num teste de rastreio da coagulação.

- Observa-se (11) um TP prolongado em diversas situações clínicas, como sendo:
 - deficiências em factores II, V, VII, X ou fibrinogénio (3)
 - insuficiência hepática (cirrose, hepatite) (10)
 - administração de antitrombina K (AVK) (5)
 - coagulação intravascular disseminada (CIDV) (3).
- OTP também é utilizado para o cálculo da INR em doentes que recebem a terapia de antagonistas da vitamina K (4, 15). O valor da INR corresponde ao valor da relação do TP do doente com o do TP padrão elevado à potência do ISI (Índice de Sensibilidade Internacional) da tromboelastina utilizada.

INR = $\frac{\text{tempo de protrombina do doente}}{\text{tempo de protrombina de controlo}}$

Para determinar o valor do ISI de uma tromboelastina dada, os tempos de protrombina de plasmas normais e de plasmas de doentes sob AVK são determinados, por um lado, com esta tromboelastina e, por outro lado, com a tromboelastina de referência (2).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

O princípio do tempo de protrombina consiste em comparar, em presença de tromboelastina cálica, o tempo de coagulação do plasma a estudar com o de um controlo normal utilizado como referência. O teste avalia, com um todo, a atividade do factor II (protrombina), do factor V (proconvertina), do factor VII (proconvertina), do factor X (factor de Stuart) e do factor I (fibrinogénio) da coagulação.

4/ COMPOSIÇÃO

Cada kit de STA® - NeoPTimal contém uma bula com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do kit, referência dos reagentes, prazo de validade, valor do ISI (determinado nos analisadores da linha STA® e valores de calibração para os resultados em percentagens).

- Reagente 1: STA® - NeoPTimal, tromboelastina liofilizada preparada a partir de extrato de cérebro de coelho. O valor de ISI do STA® - NeoPTimal, determinado relativamente a um padrão secundário da RBT (tromboelastina de cérebro de coelho) de acordo com o método recomendado pela WHO (World Health Organization) é indicado na bula fornecida na embalagem. O valor do ISI para o STA® - NeoPTimal é próximo de 1,0.
- O STA® - NeoPTimal contém um inibidor da heparina, o que permite reverter um prolongamento do tempo de protrombina a um delfe real em factores II, V, VII, X e/ou fibrinogénio (ver o capítulo 11).

Reagente 2: solvente que contém cálcio, 5-mL, 10-mL ou 20-mL por frasco, de acordo com o tamanho da embalagem.

Reagente 2 contém ácido adípico ($\approx 1 \text{ g/L}$) como conservante. Os reagentes que contêm ácido adípico devem ser manuseados com precaução. Se estes reagentes se oxidarem e se oxidarem se oxidarem, é necessário substituí-los com água destilada e estéril. A água estéril é formada por adição de água destilada, em grande quantidade, podem provocar espumas.

5/ PRECAUÇÕES

Os kits devem ser conservados a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico in vitro. Estes reagentes só podem ser utilizados por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.

Certifique-se de que mistura os frascos do Reagente 1 com os frascos do Reagente 2 do mesmo lote.

Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual de Referência" relativo ao equipamento utilizado.

Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes.

O Reagente 2 contém hexadilhato de sulfato de níquel. Na concentração fornecida (< 0,1 %), este reagente é classificado como sensibilizante.

H317: Pode provocar uma reação alérgica cutânea.

P303 + P361: Usar roupas de proteção/vestimenta de proteção/proteção ocular/proteção facial.

P303 + P361: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão e água.

Alguns dos reagentes destes kits contêm produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação destes reagentes, são utilizados métodos validados para a detecção do antígeno Hbs e dos anticorpos anti-HCV, anti-HV 1 e anti-HV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método detecta uma percentagem total da existência de agentes infecciosos. Assim, estes reagentes de origem biológica devem ser manipulados com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.

A eliminação de resíduos deve seguir-se de acordo com a regulamentação local em vigor.

Para um utilizador na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/UE relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro): caso, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da respetiva utilização, ocorra um incidente grave, comunique o mesmo ao fabricante e à autoridade nacional.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.

- Coletar o sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue (12, 14).

Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g. Como alternativa, centrifugar o tubo de amostra com a velocidade e o tempo necessários para produzir plasma pobre em plaquetas (< 10 000 plaquetas/ μL). O processo de centrifugação alternativo deve ser validado localmente. Consultar a CLSI H21 para mais detalhes.

- Conservação do plasma: 24 horas a 20 ± 5 °C (14).
Não conservar a 2-8 °C (1).

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

Preparação

Transferir o conteúdo de um frasco de Reagente 2 (R2) num frasco de Reagente 1 (R1) incluído no mesmo lote. Deixar o reagente estabilizar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, **agite muito vigorosamente, durante 10 segundos, o frasco do Reagente 1 para obter uma suspensão homogênea**. Posteriormente, adicione um agitador magnético ao frasco:

- Para o STA® - NeoPTimal 5, 10, use o agitador magnético branco (REF 27425).
- Para o STA® - NeoPTimal 20 em instrumentos da família STA-R®, use o agitador magnético branco (REF 27425).
- Para o STA® - NeoPTimal 20 em instrumentos da família STA Compact®, use o agitador magnético vermelho (REF 26674).

Coloque um novo STA® - Reducer (REF 00797) para o STA® - NeoPTimal 5 ou REF 00801 para o STA® - NeoPTimal 10 e a cápsula de plástico operada (STA® - NeoPTimal 5 ou 10).

As barras magnéticas utilizadas para homogeneização do reagente não devem dar origem a contaminações. Para evitar que tal aconteça, antes de qualquer transferência da barra magnética para um novo frasco, lavar a barra magnética com água destilada e seca-la, por forma a eliminar qualquer vestígio de humidade. Além disso, efectuar semanalmente uma descontaminação da barra magnética, procedendo da seguinte forma:

- colocar a barra magnética sob agitação num frasco de STA® - Desorb U (REF 00075) durante 5 minutos;
- transferir-lo para um frasco de água destilada e deixar sob agitação durante 5 minutos;
- repetir esta última operação com um novo frasco de água destilada;
- secar a barra magnética por forma a eliminar qualquer vestígio de humidade.

Conservação

Quando conservados a 2-8 °C na embalagem de origem, os reagentes mantêm-se estáveis até ao prazo de validade indicado na embalagem.

Após reconstituição, o STA® - NeoPTimal 5 mantém-se estável:

- com barra magnética, STA® - Reducer e cápsula de plástico operada;
- 48 horas nos analisadores das famílias STA-R® e STA Compact®;
- 4 dias nos analisadores da família STA Satellite®.

– no frasco de origem tapado (retirar o STA® - Reducer): 8 dias a 2-8 °C.

Após reconstituição, o STA® - NeoPTimal 10 mantém-se estável:

- com barra magnética, STA® - Reducer e cápsula de plástico operada;
- 48 horas nos analisadores das famílias STA-R® e STA Compact®;
- 4 dias nos analisadores da família STA Satellite®.

Após reconstituição, o STA® - NeoPTimal 20 mantém-se estável:

- com barra magnética;
- 48 horas nos analisadores das famílias STA-R® e STA Compact®.

Não congelar.

NB: Considerando as várias combinações de condições de conservação (a bordo do equipamento e/ou a 2-8 °C), cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio prazo de estabilidade de acordo com a sua prática. Este prazo não deverá exceder a estabilidade referida acima, a qual foi determinada sob condições controladas.

No caso de conservação a 2-8 °C, deixar os reagentes estabilizar à temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos antes de utilizar.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- STA® - Owen-Koller (REF 00306).
- STA® - System Control N + P (REF 00678), STA® - Coag Control N + P (REF 00679), STA® - Routine QC 2 ml (REF 00554) ou STA® - Routine QC 5 PLUS (REF 00714): controlos normal e anormal.
- Analisadores das famílias STA-R® ou STA Compact® (STA® - NeoPTimal 5, 10 ou 20).
- Analisadores da família STA Satellite® (STA® - NeoPTimal 5 ou 10).
- STA® - mini Reducer (REF 00797) para STA® - NeoPTimal 5.
- STA® - maxi Reducer (REF 00801) para STA® - NeoPTimal 10.
- Agitador magnético (REF 27425) para o STA® - NeoPTimal 5, 10 ou STA® - NeoPTimal 20 em instrumentos da família STA-R®.
- Agitador magnético (REF 26674) para o STA® - NeoPTimal 20 para instrumentos da família STA Compact®.

Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração

A pré-calibração TP é idêntica para todos os frascos de um mesmo lote. Para introduzir os valores de calibração no aparelho, proceder à leitura do código de barras impresso na bula diante do leitor de códigos de barras do aparelho. A calibração será validada para todo o lote, após determinação do TP dos dois níveis de controlo.

Uma curva de calibração pode ser visualizada no ecrã do aparelho a partir do menu "Calibration" (ver o "Manual de Referência").

9.2. Plasmas a testar

Os plasmas a testar são utilizados em estado puro. São introduzidos no instrumento (ver o "Manual de Referência" relativo ao aparelho utilizado). Selecionar o(s) teste(s) a efectuar no plasma dos pacientes.

9.3. Controlos

Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Devem ser utilizados dois níveis de controlo diferentes. Preparar estes controlos e transferir para o aparelho as informações contidas nos códigos de barras da bula. Estes controlos são utilizados em estado puro.

9.4. Ensaio

Para a realização do teste, consulte o protocolo descrito em "Test Setup" (Configuração de teste) do instrumento.

O ensaio é realizado automaticamente pelo instrumento (consultar o Manual de Referência).

10/ RESULTADOS

O tempo de protrombina das amostras testadas é visualizado em tempo real, no painel do analisador (segundos, INR, % proporção), no ecrã do aparelho (ver o "Manual de Referência"). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Verificar se os resultados obtidos para os controlos se situam dentro do intervalo indicado na bula incluída no kit. Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos limites indicados na bula incluída no kit, é necessário verificar se o sistema está a funcionar convenientemente: condições operacionais, reagentes, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir os ensaios.

11/ LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- Coletar**
Um início mínimo da coagulação (micro-coágulos) dá origem a uma redução importante dos tempos medidos (activação auto-catalítica do conjunto dos factores), enquanto que uma coagulação mais extensa prolonga estes mesmos tempos (consumo dos factores e do fibrinogénio).
- Anticoagulante**
Respetar a relação entre o volume de anticoagulante e o do sangue recolhido. Em caso de variação importante do hematócrito, modificar a quantidade do anticoagulante em função de tal variação.
- Eparine**
O método STA® - NeoPTimal não é sensível às seguintes substâncias: heparinas não fracionadas (até 1,0 UI/mL) e heparinas de baixo peso molecular (até 1,5 UI anti-XmL). Testes efectuados de acordo com a diretiva CLSI EP07-A2 (9).
- INR**
STA® - NeoPTimal é insensível à hemoglobina (até 40 g/L), bilirrubina conjugada (até 342 $\mu\text{mol/L}$, bilirrubina não conjugada (até 342 $\mu\text{mol/L}$) e triglicéridos (até 37 mmol/L). Testes efectuados de acordo com a diretiva CLSI EP07-A2 (9).
- Daptoquina**
O teste STA® - NeoPTimal é insensível à daptoquina até 225 $\mu\text{g/mL}$. Testes efectuados de acordo com a diretiva CLSI EP07-A2 (9).
- Inibidores da trombina e do factor Xa**
Estes inibidores presentes na amostra a testar são susceptíveis de provocar um prolongamento do tempo de protrombina desta amostra (8, 6).

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

Os valores normais variam consoante o laboratório, dependendo dos reagentes, dos instrumentos e da técnica utilizada. Como tal, cada laboratório deve determinar os seus próprios valores esperados com base na técnica e nos instrumentos utilizados.

Se os resultados do TP forem expressos em percentagem de atividade normal, os valores normais esperados devem ser maiores do que 70 % (19). Os valores mais altos do que 100 % não têm qualquer significado patológico.

Por exemplo, 125 plasmas humanos presumidamente normais foram testados com o STA® - NeoPTimal no STA-R®, STA Compact® e STA Satellite®. De acordo com a CLSI EP28-A3c (20) o TP médio definido é de $13,5 \pm 1,8$ segundos.

13/ TRATAMENTO POR ANTITROMBINA K

- As antitrombina K (AVK) provocam uma redução do nível plasmático dos factores II (protrombina), VII (proconvertina), X (factor Stuart) e IX (factor anti-hemofílico B).
- Para a supervisão dos tratamentos por AVK, consultar as recomendações em vigor.

14/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Foram utilizadas várias amostras para a repetibilidade e em estudos de precisão intralaboratorial. Os resultados obtidos com o STA® - NeoPTimal da STA-R® são apresentados abaixo. Foram realizados estudos de precisão em conformidade com o documento orientador EP05-A1 (17) da CLSI.

Amostra	Repetibilidade		Precisão intra-laboratorial	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
3 (g)	80	80	80	80
3 (g)	15,0	28,0	15,0	28,0
SD (%)	0,12	1,36	0,18	1,56
CV (%)	0,8	1,3	1,2	2,0

15/ COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

Um estudo de correlação de 403 amostras foi realizado com o STA® - NeoPTimal e o Thromborep® S da Siemens. Os resultados obtidos foram os seguintes: $r = 0,98$, tendência = 1,09 e ordenada de origem = -0,01.

Figura 5 - Bula Neoptimal



16/ PROTOCOLOS ALTERNATIVOS

Os capítulos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 e 13 acima são igualmente válidos para o teste em método semi-automático.

Este protocolo é aplicável para o STA® - NeoPTimal 5 (REF 01163) nos analisadores da família ST art® (método semi-automático).

16.1. Preparação e conservação dos reagentes

• Preparação

Transvasar o conteúdo de um frasco de Reagente 2 (R2) num frasco de Reagente 1 (R1) incluído no mesmo lote. Deixar o reagente estabilizar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C). **Em seguida, agite muito vigorosamente, durante 10 segundos, o frasco do Reagente 1 para obter uma suspensão homogênea.** Em seguida, adicione uma barra magnética (REF 26405) ao frasco. As barras magnéticas utilizadas para homogeneização do reagente não devem dar origem a contaminações. Para evitar que tal aconteça, antes de qualquer transferência da barra magnética para um novo frasco, lavar a barra magnética com água destilada e secá-la, por forma a eliminar qualquer vestígio de humidade. Além disso, efectuar semanalmente uma descontaminação da barra magnética, procedendo da seguinte forma:

- colocar a barra magnética sob agitação num frasco de STA® - Desorb U (REF 00975) durante 5 minutos;
- transferi-lo para um frasco de água destilada e deixar sob agitação durante 5 minutos
- repetir esta última operação com um novo frasco de água destilada
- secar a barra magnética por forma a eliminar qualquer vestígio de humidade.

• Conservação

Quando conservado a 2-8 °C na embalagem de origem, o reagente mantém-se estável até ao prazo de validade indicado na embalagem.

Após reconstituição, o reagente mantém-se estável :

- 8 horas a 37 °C (agitado no analisador),
- 48 horas a 20 ± 5 °C e
- 8 dias a 2-8 °C.

Não congelar.

NB : Considerando as várias combinações de condições de conservação (parcialmente a bordo, parcialmente a 20 ± 5 °C ou 2-8 °C), cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio prazo de estabilidade de acordo com a sua prática. Este prazo não deverá exceder a estabilidade referida acima, a qual foi determinada sob condições controladas.

No caso de conservação a 2-8 °C, deixar os reagentes estabilizar à temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos antes de utilizar.

16.2. Reagentes e material auxiliares

- STA® - Owren-Koller (REF 00360).
- Unicallibrator (REF 00625) ou Etaloquick (REF 00496).
- Coag Control [N] + [P] (REF 00621) ou System Control [N] + [P] (REF 00617): controlos normal e anormal.
- Instrumentos da família ST art®.
- Agitador magnético (REF 26405).
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

16.3. Plasmas a testar e Controlos

Os plasmas a testar ou os controlos são utilizados em estado puro.

16.4. Protocolo

Consulte a aplicação do instrumento.

16.5. Resultados

O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do paciente.

Verificar se os valores obtidos para os controlos se situam dentro dos intervalos indicados na bula incluída nas embalagens de Coag Control [N] + [P] ou System Control [N] + [P] controlos.

Se os valores de controlo estiverem fora dos intervalos referidos, verificar todos os componentes do sistema de teste para confirmar que todos estão a funcionar corretamente, ou seja, condições de ensaio, reagentes, integridade dos plasmas a serem testados etc. Se necessário, repita o teste.

16.6. Intervalo de referência

Os valores normais poderão variar de laboratório para laboratório, dependendo dos reagentes, instrumentos e técnicas. Como tal, cada laboratório deve determinar os seus próprios valores esperados com base na técnica e na instrumentação utilizadas.

Se os resultados do TP forem expressados em percentagem de atividade normal, os valores normais expectáveis devem ser superiores a 70 % (19). Valores superiores a 100 % não têm significado patológico.

Para informação, 112 plasmas humanos presumidamente normais foram testados com o STA® - NeoPTimal 5 no ST art Max®.

O intervalo de referência observado foi de 13,2 seg. – 16,9 seg.

16.7. Características de desempenho

Os estudos de precisão foram realizados de acordo com a "guideline" CLSI EP05-A3 (17) utilizando amostras de controlo (20 dias, 2 séries por dia, diferentes operadores). Os resultados obtidos pelo analisador ST art Max® com STA® - NeoPTimal 5 são apresentados abaixo:

Amostra	Repetibilidade		Precisão intra-laboratorial	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
n	80	80	80	80
$\bar{X}$ (s)	14,7	26,9	14,7	26,9
SD (s)	0,25	0,46	0,50	1,32
CV (%)	1,7	1,7	3,4	4,9

16.8. Comparação de métodos

Foi realizado um estudo de correlação em 144 amostras com o STA® - NeoPTimal 5 nos analisadores ST art Max® e STA R Max® da Stago. Os resultados obtidos são os seguintes: $r = 0,998$, declive = 1,1, interceção em $y = -0,4$ s.

O Resumo de segurança e desempenho deste dispositivo pode ser transferido a partir da EUDAMED (Base de dados europeia), quando operacional, e está igualmente disponível através do seu representante local.

BIBLIOGRAFIA

1. GJONNAESS H., FAGERHOL M.K.: "Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy". Acta Obstet. Gynecol. Scand., **54**, 363-367, 1975.
2. BEESER H.: "Critical evaluation of the so far experience using the WHO model of prothrombin time calibration and outlook for further development". Haemostasis, **18**, suppl., 2, 181-182, 1988.
3. LUSHER J.M.: "Screening and diagnosis of coagulation disorders". Am. J. Obstet. Gynecol., **175**, 778-783, 1996.
4. BCSH: "Guidelines on oral anticoagulation: third edition". Br. J. Haematol., **101**, 374-387, 1998.
5. RILEY R.S., ROWE D., FISHER L.M.: "Clinical utilization of the international normalized ratio (INR)". J. Clin. Lab. Anal., **14**, 101-114, 2000.
6. FENYVESI T., JOERG I., HARENBERG J.: "Influence of Lepirudin, Argatroban, and Melagatran on prothrombin time and additional effect of oral anticoagulation". Clin. Chem., **48**, 1791-1794, 2002.
7. TOBU M., IQBAL O., MESSMORE H.L., et al.: "Influence of different anticoagulant agents on fibrinopeptide A generation". Clin. Appl. Thromb. Hemost., **9**, 273-292, 2003.
8. TOBU M., IQBAL O., HOPPENSTEADT D., et al.: "Anti-Xa and anti-IIa drugs alter International Normalized Ratio measurements: Potential problems in the monitoring of oral anticoagulants". Clin. Appl. Thromb. Hemost., **10**, 301-309, 2004.
9. CLSI Document EP07-A2: "Interference testing in clinical chemistry; approved guideline". Second Edition, **25**, 27, 2005.
10. TROTTER J.F.: "Coagulation abnormalities in patients who have liver disease". Clin. Liver Dis., **10**, 665-678, 2006.
11. KAMAL A.H., TEFFERI A., PRUTHI R.K.: "How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults". Mayo Clin. Proc., **82**, 864-873, 2007.
12. CLSI Document GP41-A6: "Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard". Sixth edition, **27**, 26, 2007.
13. WEBSTER P.S., et al.: "Interaction of daptomycin with two recombinant thromboplastin reagents leads to falsely prolonged patient prothrombin time/International Normalized Ratio results". Blood Coagulation and Fibrinolysis, **19**, 32-32, 2008.
14. CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". Fifth Edition, **28**, 5, 2008.
15. HOLBROOK A., SCHULMAN S., WITT D.M., VANDVICK P.O., FISH J., KOVACS M.J., SVENSSON P.J., VEENSTRA D.L., CROWTHER M., GUYATT G.H.: "Evidence-based management of anticoagulant therapy: Antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9th ed: American college of chest physicians, evidence-based clinical practice guidelines", **141**, e152S-e184S, Chest 2012.
16. EBY C.: "Novel anticoagulants and laboratory testing". International Journal of Laboratory Hematology, **35**, 262-268, 2013.
17. CLSI Document EP05-A3: "Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline". Third Edition, **34**, 13, 2014.
18. ADCOCK D.M., GOSSELIN R.: "Direct Oral Anticoagulants (DOACs) in the Laboratory: 2015 Review". Thrombosis Research, **136**, 7-12, 2015.
19. SAMPOL J., ARNOUX D., BOUTIERE B.: "Manuel d'hémostase". Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier, 147-163, 1995.
20. CLSI Document EP28-A3c: "Defining, Establishing, and verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; approved guideline". Third Edition, **30**, 28, 2010.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

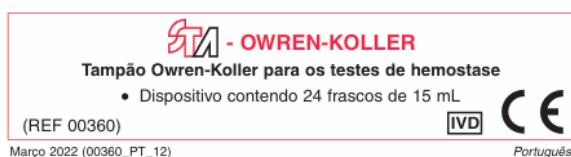
DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.

3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
www.stago.com



As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos de propriedade intelectual. © 2023, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logótipos e/ou os nomes dos produtos de Diagnostica Stago são marcas registradas. Português

Figura 5 – Bula Neoptimal (continuação)



1/ FINALIDADE

O reagente **STA® - Owren-Koller** é utilizado como tampão de diluição para reagentes e plasmas humanos nos testes de hemostase realizados com os analisadores das famílias STA-R®, STA Compact®, STA Satellite® e ST art®.

2/ COMPOSIÇÃO

Cada dispositivo de STA® - Owren-Koller contém uma etiqueta com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do dispositivo, referência do reagente e prazo de validade.

STA® - Owren-Koller: solução tamponada* apresentando um pH de cerca de 7,35.

Este reagente contém azida sódica (< 1 g/L) como conservante. Os reagentes contendo azida sódica devem ser eliminados com precaução. Se estas soluções se destinarem a ser eliminadas na canalização, é necessário misturá-las com água corrente em abundância, a fim de evitar a formação de azidas metálicas que, quando em grande concentração, podem provocar explosões.

* In RABY C.: "Biologie des hémorragies et des thromboses", Paris: Masson et Cie, 72-73, 1966.

3/ PRECAUÇÕES

A embalagem intacta deve ser conservada à temperatura de 2-8 °C. Exclusivamente destinado utilização para diagnóstico *in vitro*. Este reagente só pode ser utilizado por pessoal habilitado para o efeito, autorizado pelo laboratório.

Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual de Referência" relativo ao equipamento utilizado.

Manipular com as precauções os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação de resíduos deverá processar-se de acordo com a regulamentação local em vigor.

Para um utilizador na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/UE relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*): caso, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da respetiva utilização, ocorra um incidente grave, comunique o mesmo ao fabricante e à autoridade nacional.

Está disponível uma folha de dados de segurança mediante pedido, se exigido pela regulamentação local.

4/ PREPARAÇÃO DO REAGENTE

Deixar o reagente estabilizar à temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos antes de utilizar.

Ao utilizar este reagente nos aparelhos das famílias STA-R®, STA Compact® e STA Satellite®, não colocar o STA® - Reducer nem a cápsula de vedação.

5/ ESTABILIDADE E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

Quando conservado à temperatura de 2-8 °C em estado original, o reagente mantém-se estável até ao termo do prazo de validade indicado na embalagem.

Após a abertura, o reagente mantém-se estável durante:

- 3 dias nos analisadores das famílias STA-R® e STA Compact®
- 6 dias nos analisadores da família STA Satellite®.

Em caso de utilização fraccionada, a solução restante de STA® - Owren-Koller mantida a 2-8 °C no frasco de origem devidamente rolhado, conserva-se estável, desde que não contaminada, até ao termo do prazo de validade indicado no frasco.

6/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- Reagentes para a realização dos testes de hemostase.
- Analisadores das famílias STA-R®, STA Compact®, STA Satellite® ou ST art®.
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

7/ MODO DE USAR

- Com analisadores da família ST art®, sugerimos consultar as instruções correspondentes aos testes a realizar.
- Nos aparelhos das famílias STA-R®, STA Compact® e STA Satellite®, após a abertura do frasco, introduzi-lo no equipamento como indicado no "Manual de Referência" relativo ao instrumento utilizado. O posicionamento do frasco deverá respeitar as seguintes instruções:
 - nos STA-R®, colocar o frasco na zona R0 da gaveta de produtos
 - nos STA Compact®, colocar o frasco na gaveta de amostras
 - nos STA Satellite®, colocar o frasco no carrinho de produtos.
 O equipamento utiliza automaticamente o STA® - Owren-Koller (ver o "Manual de Referência").

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
www.stago.com

stago

As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos de propriedade intelectual. © 2022, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logótipos e/ou os nomes dos produtos de Diagnostica Stago são marcas registadas.

Figura 6 – Bula Owren-Koller

UNICALIBRATOR
Plasma de calibração para os testes de coagulação

• Kit de 6 x 1 mL frascos

(REF 00625) IVD CE

Setembro 2022

Português

1/ FINALIDADE

Unicalibrator é um plasma utilizado para aferição das quantificações dos parâmetros seguintes:

Parâmetro	Dispositivo	REF
Tempo de Quick (TP)	Néoplastine® CI Plus	00375, 00376
Fibrinogénio	Fibri-Prest® [A]utomate ② STA® - Liquid Fib	00613 00673
Factor II	STA® - Deficient II	00745
Factor V	STA® - Deficient V	00744
Factor VII	STA® - Deficient VII	00743
Factor VIII	STA® - Deficient VIII	00725
Factor IX	STA® - Deficient IX	00724
Factor X	STA® - Deficient X	00738
Factor XI	STA® - Deficient XI	00723
Factor XII	STA® - Deficient XII	00722
Antitrombina (AT)	Liatest® AT III	00568
Proteína C	STA® - Staciot® Protein C ③	00747
Proteína S	STA® - Staciot® Protein S	00746

O TP é um teste global de análise da hemostase. Os factores VII, XII, XI, IX, VIII, V, X, II e fibrinogénio estão implicados na coagulação propriamente dita. A AT, a proteína C e a proteína S são inibidores fisiológicos da coagulação.

2/ COMPOSIÇÃO

Unicalibrator: plasma humano normal com citrato, liofilizado.

Este reagente contém produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação deste reagente, são utilizados métodos validados para a detecção do antígeno HBs e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, este reagente de origem biológica deve ser manipulado com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.

3/ AVISOS E PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico *in vitro*. Este reagente só pode ser utilizado por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.

Manipular com precauções os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação dos resíduos deverá processar-se de acordo a regulamentação local em vigor.

4/ PREPARAÇÃO DO REAGENTE

Reconstituir cada frasco com exactamente 1 mL de água destilada. Deixar a solução estabilizar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, homogeneizar antes de utilizar.

5/ ESTABILIDADE DO REAGENTE

- **Liofilizado:** a 2-8 °C, até ao prazo de validade indicado na embalagem.
- **Reconstituído:** 4 horas a 20 ± 5 °C.
Não congelar.

6/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- Reagentes que permitem a realização dos testes indicados no capítulo 1.
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

7/ MODO DE UTILIZAÇÃO

Seguir as indicações descritas no folheto informativo do dispositivo de quantificação do parâmetro a testar.

8/ CARACTERÍSTICAS

A taxa dos diferentes parâmetros pode variar de um lote para outro, mas ela está especificamente indicada para cada lote (ver a etiqueta incluída na embalagem).

As taxas de fibrinogénio, dos factores II, V, VII, VIII, IX, X, XI, de AT, de proteína C e de proteína S são determinadas com relação a padrões secundários das Normas Internacionais existentes, designadamente:

- 09/264 estabelecido em 2011 para o fibrinogénio
- 09/172 estabelecido em 2010 para os factores II, VII, IX, X
- 16/374 estabelecido em 2018 para o factor V
- 07/316 estabelecido em 2009 para o factor VIII
- 15/180 estabelecido em 2016 para o factor XI
- 08/258 estabelecido em 2010 para o AT
- 02/342 estabelecido em 2006 para a proteína C
- 03/228 estabelecido em 2006 para a proteína S.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
webmaster@stago.com



As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos de propriedade intelectual. © 2022, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logótipos e/ou os nomes dos produtos de Diagnostica Stago são marcas registadas.

Figura 6 – Bula Unicalibrator

Determinação quantitativa do fibrinogénio segundo Claus

Dispositivo de 12 frascos de 4 mL

(REF 00673) 0459

Decreto 2002/00673_FT_08

Portugal

1/ FINALIDADE

Quantificação do fibrinogénio em plasma humano citratado segundo o método de Claus (1) nos analisadores das famílias STA-R®, STA Compact® e STA Satellite®.

2/ INTERESSE CLÍNICO

O fibrinogénio é uma glicoproteína de cerca de 340 000 daltons (7), cuja concentração plasmática, em relação aos outros fatores de coagulação, é elevada (2 a 4 g/L) (2). O fibrinogénio é sintetizado no fígado (1,7 a 5 g/L) (7). Esta síntese do fibrinogénio é controlada pelo gene por ele codificado para a síntese da cadeia I (3). Dada a existência de um polimorfismo genético ao nível deste gene, o nível plasmático do fibrinogénio varia de indivíduo para indivíduo (3). A semi-vida do fibrinogénio é de aproximadamente 3 a 5 dias (7). O fibrinogénio é constituído por 6 cadeias peptídicas, simétricas 2 a 2 (5). O fibrinogénio é transformado em fibrina pela trombina, que liberta 2 peptídeos A (PPA) e 2 peptídeos B (PPB) a partir, respectivamente, das cadeias A₁ e B₁ (5). As moléculas de fibrina agregam-se e formam um coágulo estabilizado pelo factor XIIIa (3, 5). A primeira etapa desta estabilização consiste na ligação de duas cadeias I de monómeros de fibrina diferentes (5). Tal ligação está na origem da existência do D-dímero, produto de degradação específico da fibrina (3). Observa-se um aumento do nível de fibrinogénio plasmático nos casos de diabetes, de síndrome inflamatória, de obesidade (3, 7); este nível diminui em caso de consumo excessivo de fibrinogénio (CVD, fibrinogénio) (3). Além disso, o fibrinogénio parece estar implicado na patogénese dos acidentes trombóticos cardiovasculares (3, 7).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

Em presença de um excesso de trombina, o tempo de coagulação de um plasma, diluído em proporções adequadas, depende directamente do nível de fibrinogénio plasmático (3).

4/ COMPOSIÇÃO

Cada kit de STA® - Liquid Fib contém uma bula com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do kit, referência do reagente, prazo de validade e parâmetros de calibração. STA® - Liquid Fib: trombina cálcica titulada (aprox. 100 unidades NtHmL), de origem humana contendo um inibidor específico da heparina que permite a quantificação do fibrinogénio no plasma de pacientes tratados com este anticoagulante.

5/ PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico *in vitro*. Este reagente só pode ser utilizado por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório. Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual de Referência" relativo ao equipamento utilizado. Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes. Este reagente contém a mistura 5-cloro-2-metil-2H-isotiazol-3-one / 2-metil-2H-isotiazol-3-one na proporção de 3:1. Na concentração fornecida (< 0,06 %), esta mistura é considerada como sensibilizante. Atenção: H317: Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. P280: Usar luvas de protecção/vestimento de protecção/protecção ocular/protecção facial. P302 + P332: SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabão e água abundantes. Este reagente contém produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação deste reagente, são utilizados métodos validados para a detecção do antígeno HBS e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, este reagente de origem biológica deve ser manipulado com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos. A eliminação de resíduos deverá processar-se de acordo com a regulamentação local em vigor. Para um utilizador na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/745/EU relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*), caso, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da respetiva utilização, ocorra um incidente grave, comunique o mesmo ao fabricante e à autoridade nacional.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostasias.

- Colher o sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue.
- Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g. Como alternativa, centrifugar o tubo de amostra com a velocidade e o tempo necessários para produzir plasma pobre em plaquetas (< 10 000 plaquetas/L). O processo de centrifugação alternativo deve ser validado localmente. Consultar a CLSI H21 para mais detalhes.
- Conservação do plasma: 8 horas a 20 ± 5 °C.

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

Preparação

Antes da utilização, deixar o reagente estabilizar durante 30 minutos, a temperatura ambiente (18-25 °C). Homogeneizar. Em seguida, colocar um STA® - mini Reducer novo (REF 00797) e a cápsula operculada. O reagente está pronto a utilizar.

Conservação

Quando conservado a 2-8 °C na embalagem de origem, o reagente mantém-se estável até ao prazo de validade indicado na embalagem. Após a abertura, com STA® - mini Reducer e cápsula operculada, o reagente mantém-se estável durante 10 dias nos analisadores das famílias STA-R®, STA Compact® e STA Satellite®.

Após a primeira abertura, a solução restante, quando conservada a 2-8 °C no frasco de origem devidamente tapado, poderá ainda ser utilizada até 2 meses depois, desde que isenta de contaminação.

Não congelar.

NB: Considerando as várias combinações de condições de conservação (a bordo do equipamento e/ou a 2-8 °C), cada laboratório deverá estabelecer o seu próprio prazo de estabilidade de acordo com a sua prática. Este prazo não deverá exceder a estabilidade referida acima, a qual foi determinada sob condições controladas. No caso de conservação a 2-8 °C, deixar o reagente estabilizar a temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos antes de utilizar.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- STA® - Owen-Koller (REF 00675), se não for seleccionada a pré-calibragem.
- Calibração: STA® - Unicallibrator (REF 00675), se não for seleccionada a pré-calibragem.
- Controlo de qualidade: STA® - Coag Control [N] + [P] (REF 00670), STA® - System Control [N] + [P] (REF 00678) ou STA® - Routine QC 2 ml (REF 00554).
- Analisadores das famílias STA-R®, STA Compact® ou STA Satellite®.
- STA® - mini Reducer (REF 00797).
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração

- **Protocolo de pré-calibração**
O reagente é pré-calibrado com relação a um padrão secundário da Norma Internacional 09/264, estabelecida em 2011; esta pré-calibração é idêntica para todos os reagentes de um mesmo lote. Para introduzir as coordenadas de calibração no instrumento, fazer passar o código de barras impresso na etiqueta diante do leitor de códigos de barras do aparelho. A calibração será validada para todo o lote, após determinação do nível de fibrinogénio de dois controlos. A calibração pode ser visualizada no ecrã a partir do menu "Calibração" (ver o "Manual de Referência").
- **Protocolo de calibração com STA® - Unicallibrator**
Em alternativa ao protocolo de pré-calibragem, a calibragem pode ser igualmente efectuada com o STA® - Unicallibrator, desde que tenha sido seleccionado o teste de inicialização correcto (ver o "Manual de Referência"). Preparar STA® - Unicallibrator e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras da etiqueta. Os diferentes pontos da gama de calibração serão efectuados automaticamente pelo aparelho em STA® - Owen-Koller, segundo as modalidades inscritas na configuração do teste. A calibração pode ser visualizada no ecrã a partir do menu "Calibração" (ver o "Manual de Referência").

9.2. Plasmas a testar

Os plasmas a testar são utilizados em estado puro. São introduzidos no instrumento (ver o "Manual de Referência" relativo ao aparelho utilizado). As diluições em STA® - Owen-Koller é realizada automaticamente pelo aparelho. Seleccionar (o) teste(s) a efectuar no plasmas dos pacientes.

9.3. Controlos

Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Devem ser utilizados dois níveis de controlo diferentes. Preparar estes controlos e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras de cada uma das duas etiquetas. Estes controlos são utilizados em estado puro.

9.4. Ensaio

Para a realização do ensaio, consultar o protocolo descrito no "Test Setup" do equipamento. O equipamento iniciará a análise logo que o carregamento das amostras estiver completo. Se o resultado obtido para um determinado plasma se situar fora do intervalo de linearidade, o instrumento realiza automaticamente a diluição apropriada para esta amostra e repete a determinação, desde que esta funcionalidade tenha sido definida na configuração do teste (ver o "Manual de Referência").

10/ RESULTADOS

O nível de fibrinogénio das amostras testadas é visualizado em tempo real, na unidade escolhida pelo operador, no painel do analisador (ver o "Manual de Referência"). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Verificar se os resultados obtidos para os controlos se situam dentro do intervalo indicado na bula incluída no kit. Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos intervalos indicados nas bulas destes controlos, verificar o funcionamento correcto de todo o sistema: condições operatórias, reagentes, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir as quantificações.

11/ LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- Quando o ensaio do fibrinogénio se destina a ser realizado em amostras colhidas em doentes a receberem terapêutica trombolítica e sem a adição de uma mistura de anticoagulante contendo um inibidor de plasmina no tubo de colheita, os resultados do fibrinogénio podem ser subestimados.
- Foi demonstrado que os produtos de degradação da fibrina, a fibrinina, as heparinas (HNF e HBPM), o dabigatran, o rivaroxaban, o apixaban e o edoxaban não interferem com este ensaio até às concentrações de 120 µg/mL, 3 µg/mL, 2 UI/mL, 500 ng/mL, 1,2 µg/mL, 500 ng/mL e 500 ng/mL, respectivamente.
- O método STA® - Liquid Fib não é sensível às seguintes substâncias: hemoglobina (até 2 g/L), bilirrubina conjugada (até 0,29 g/L), bilirrubina não conjugada (até 0,2 g/L) e triglicéridos (até 22,9 g/L).

Testes efectuados de acordo com a directiva CLSI EP07-A2 (6).

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

O nível plasmático do fibrinogénio no adulto está geralmente compreendido entre 2 e 4 g/L (200-400 mg/dL) (2). No entanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais. Durante a gravidez observa-se um aumento do nível de fibrinogénio (3, 7).

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

- **Intervalo de linearidade - Intervalo de medição**
Com uma diluição do plasma a testar a 1/20, o intervalo de linearidade nos analisadores das famílias STA-R®, STA Compact® e STA Satellite® varia entre 1,0 e 8,0 g/L. O âmbito de medição pode ser prolongado desde 0,4 g/L até 12,0 g/L na repetição automática do teste de plasma, a diluição apropriada (ver secção 9.4).
- **Limite da quantificação** (ver secção 9.4).
O limite da quantificação é de 0,35 g/L.

- **Estudos de reprodutibilidade intra e inter ensaio** foram realizados numa amostra normal e anormal. Os resultados obtidos no STA-R® estão indicados no quadro seguinte:

Amostra	Reprodutibilidade intra-ensaio		Reprodutibilidade inter-ensaio	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
n	21	21	10	10
X (g/L)	2,83	1,03	2,84	1,03
SD (g/L)	0,06	0,05	0,06	0,03
CV (%)	2,1	4,9	2,1	3,2

Reprodutibilidade intra-ensaio testada com 21 medições consecutivas.

Reprodutibilidade inter-ensaio testada em 10 dias diferentes.

14/ COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

Um estudo de correlação com 671 amostras foi realizado com os kits STA® - Liquid Fib e STA® - Fibrinogen (®) em diferentes laboratórios.

Os resultados obtidos foram os seguintes:

1º laboratório: n = 230, r = 0,99, declive = 1,03, e intercepção = -0,12
2º laboratório: n = 175, r = 1,00, declive = 1,00, e intercepção = -0,01
3º laboratório: n = 266, r = 0,99, declive = 1,00, e intercepção = -0,13.

15/ PROTOCOLOS ALTERNATIVOS

A informação adicional abaixo não invalida mas complementa os capítulos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12 e 14 acima.

15.1. Preparação e conservação do reagente

Quando conservado a 2-8 °C na embalagem de origem, o reagente mantém-se estável até ao prazo de validade indicado na embalagem. Antes de utilizar, deixar o reagente estabilizar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, homogeneizar antes de utilizar (não adicionar o STA® - Reducer nem a cápsula operculada). Uma vez aberto o reagente é estável 7 dias a 20 ± 5 °C ou 2 meses quando mantido a 2-8 °C no frasco original tapado após cada utilização.

Não congelar.

No caso de conservação a 2-8 °C, deixar o reagente estabilizar à temperatura ambiente (18-25 °C) durante 30 minutos antes de utilizar.

15.2. Reagentes e material auxiliares

- STA® - Owen-Koller (REF 00680).
- Unicallibrator (REF 00625).
- Coag Control [N] + [P] (REF 00621) ou System Control [N] + [P] (REF 00617): controlos normal e anormal.
- Instrumento do tipo ST an®.
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

15.3. Plasmas a testar e controlos

Utilizar o STA® - Owen-Koller para preparar, em tubos de ensaio de plástico a diluição de 1/20 dos plasmas dos pacientes ou dos controlos.

15.4. Protocolo

Consultar a aplicação do equipamento.

15.5. Resultados

O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Asegurar-se de que os valores obtidos para os controlos estão dentro do intervalo indicado na bula com os valores do teste que é fornecida nas caixas de Coag Control [N] + [P] ou System Control [N] + [P]. Se estes resultados se situarem fora dos intervalos, verificar o funcionamento correcto do sistema: condições operatórias, reagentes, calibração, plasmas a testar, etc. Se necessário, repita o teste.

15.6. Características do método

Intervalo de medição

De acordo com a taxa de calibração e as condições de funcionamento, quando o plasma é testado na diluição apropriada (consulte a aplicação do equipamento), o ensaio do STA® - Liquid Fib tem geralmente um intervalo de medição de 0,9 g/L - 12,0 g/L.

Precisão

Os estudos de precisão foram realizados de acordo com a "guideline" CLSI EP05-A2 (4) utilizando amostras de controlo (20 dias, 2 séries por dia, diferentes operadores). Os resultados obtidos com STA® - Liquid Fib testado no ST an® foram os seguintes:

Amostra	Repetibilidade		Precisão intra-laboratorial	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
n	20	20	20	20
X (g/L)	2,50	1,08	2,50	1,08
SD (g/L)	0,04	0,02	0,12	0,04
CV (%)	1,72	1,60	4,73	3,77

BIBLIOGRAFIA

- CLAUS A.: "Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens". *Acta Haematologica*, 17, 237-246, 1963.
- ANDREOTTI F., BURZOTTA F., MASERI A.: "Fibrinogen as a marker of inflammation in clinical view". *Blood Coag Fibrinolysis*, 16, 34-199.
- MACKIE J.J., KITCHEN S., MACHIN S.J., LOWE G.D.O.: "Guidelines on fibrinogen assays". *Br. J. Haematology*, 121, 396-404, 2003.
- CLSI Document EP05-A2: "Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline". Second Edition, 24, 25, 2004.
- MOSESSON M.W.: "Fibrinogen and fibrin structure and function". *J. Thromb. Haemostasis*, 3, 1894-1904, 2005.
- CLSI Document EP07-A2: "Interference testing in clinical chemistry; approved guideline". Second Edition, 28, 27, 2005.
- HANTON R.V., LLOYD S.T.: "Fibrinogen structure and physiology" in "Haemostasis and Thrombosis - Basic principles and clinical practice". Cohen R.V., Colman A.W., Golligorsky S.Z., Marder V.J., George J.N., Lippincott Williams & Wilkins. Fifth Edition, 285-316, 2006.

As mutações significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

INFORMATICA STAGO I.S.A.S.
Lattes Therapeutics
80000 Boulevard des Bains (France)
+33 (0)1 48 88 20 20
www.stago.com



As informações aqui presentes somente tem documento
técnicos elaborado por Stago® e estão sujeitos de
alterações sem aviso prévio. Stago® não se responsabiliza
por erros de interpretação. Os resultados Stago® não são
de diagnóstico Stago® do mesmo diagnóstico. Portugal

Figura 7 - Bula Fibrinogénio



1/ FINALIDADE

STA® - Deficient V é um plasma utilizado para a determinação quantitativa da actividade do factor V no plasma humano citratado para qualquer método que requira a utilização de um plasma desprovido de factor V (1) nos STA-R® e STA Compact®.

2/ RESUMO E EXPLICAÇÃO

• Bioquímica

A estrutura do factor V plaquetário é semelhante, senão mesmo idêntica, à do factor V plasmático (8). Este último, com um peso molecular de cerca de 330 000 daltons, é constituído por uma única cadeia polipeptídica (9). O factor V é glicoproteína do sistema retículo-endoplasmático e activado pela trombina (14). O factor Va forma um complexo equimolecular com o factor Xa, em presença de íons de cálcio e de fosfolípidos. Este complexo transforma a protrombina em trombina (14). O factor Va é inactivado pelo factor Xa, a proteína C activada e a plasmina (12). Certas mutações do factor V, como por exemplo a do factor V Leiden, provocam uma resistência do factor Va à sua inactivação pela proteína C activada, favorecendo assim o aparecimento de trombose, sobretudo quando existem outros factores de risco (12).

• Variações patológicas

- Deficiência isolada em factor V
 - deficiência congénita (2, 5, 7)
 - deficiência adquirida (indutores do factor V) (5)
- Deficiência adquirida em factor V associada a outros défices em factores de coagulação
 - doença hepática (10); cirroses, hepatites
 - coagulação intravascular disseminada (CIVD) (5).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

O ensaio consiste na medição do tempo de coagulação, na presença de um reagente PT da Stago, de um sistema em que todos os factores estão presentes e em excesso (fornecido pela STA® - Deficient V) exceto o factor V que é derivado da amostra a ser testada (2).

4/ COMPOSIÇÃO

Cada kit de STA® - Deficient V contém uma etiqueta com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do kit, referência do reagente e prazo de validade.

STA® - Deficient V plasma humano liofilizado artificialmente, desprovido de factor V, fornece no sistema de quantificação os factores II, VII, X e o fibrinogénio. A actividade residual do factor V é rigorosamente inferior a 1 %. Contém actividade normal (> 50 %) de outros factores endógenos de coagulação. O fibrinogénio está também presente numa quantidade superior a 1 g/L.

5/ PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico in vitro. Este reagente só pode ser utilizado por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.

Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual de Referência" relativo ao instrumento utilizado.

Maniplular com precauções os reagentes e as amostras dos pacientes.

Este reagente contém produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação deste reagente, são utilizados métodos validados para a deteção do antígeno HBS e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, este reagente de origem biológica deve ser manipulado com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.

A eliminação dos resíduos deverá processar-se de acordo com a regulamentação local em vigor.

Para um utilizador na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/UE relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro) caso, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da respetiva utilização, ocorra um incidente grave, comunique o mesmo ao fabricante e à autoridade nacional.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.

- Colha o sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue (11, 13).
- Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g. Como alternativa, centrifugar o tubo de amostra com a velocidade e o tempo necessários para produzir plasma pobre em plaquetas (< 10 000 plaquetas/μL). O processo de centrifugação alternativo deve ser validado localmente. Consultar a CLSI H21 para mais detalhes.

- Conservação do plasma em tubo de plástico:
 - 4 horas a 20 ± 5 °C
 - 8 horas a 2-8 °C
 - 15 dias a -20 °C (6) ou 37 °C o tempo necessário e suficiente para a 1 mês a -80 °C (6) descongelação total.

Em caso de quantificação simultânea do factor VII, o plasma não deve ser conservado a 2-8 °C já que o factor VII é susceptível de se activar a esta temperatura (sistema de calcineínas) (3).

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

• Preparação

Reconstituir cada frasco com 1 mL de água destilada. Deixar o reagente estabilizar, durante 30 minutos, a temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, agitar ligeiramente para obter uma solução homogênea.

• Conservação

Liofilizado: a 2-8 °C, até ao prazo de validade indicado na embalagem. Reconstituído: 8 horas em STA Compact®.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- STA® - Neoplastine® CI Plus (REF 00606, 00667), STA® - Neoplastine® R (REF 00665) ou STA® - NeoPTmal (REF 01163, 01164, 01165).

- STA® - Owen-Koller (REF 00360).

- STA® - Unicablator (REF 00975).

- STA® - System Control [N] + [P] (REF 00678): controlo normal e anormal.

- Famílias STA-R® ou STA Compact®.

- Adaptador magnético (REF 27429).

- STA® - mini Reducer REF 00797 (STA® - Neoplastine® CI Plus ou STA® - NeoPTmal) ou STA® - maxi Reducer REF 00801 (STA® - Neoplastine® CI Plus II, STA® - Neoplastine® R ou STA® - NeoPTmal II).

- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração

A calibração é realizada por meio do STA® - Unicablator. Preparar o STA® - Unicablator e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras da etiqueta. Os diferentes pontos da gama de calibração serão automaticamente lidos pelo aparelho em STA® - Owen-Koller conforme a configuração do teste. A calibração pode ser visualizada no ecrã do aparelho a partir do menu "Calibration" (ver o "Manual de Referência").

9.2. Plasmas a testar

Os plasmas dos pacientes são utilizados em estado puro. São introduzidos no instrumento (ver o "Manual de Referência") do aparelho utilizado). As diluições em STA® - Owen-Koller são realizadas automaticamente pelo aparelho.

Seleccionar o(s) teste(s) a efectuar nos plasmas de paciente.

9.3. Controlos

Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Devem ser utilizados dois níveis de controlo diferentes. Devem ser utilizados dois níveis de controlo diferentes. Utilizar o kit STA® - System Control [N] + [P]. Preparar estes controlos e transferir para o instrumento as informações do código de barras de cada uma das duas etiquetas. Estes controlos são utilizados em estado puro: a diluição em STA® - Owen-Koller é realizada automaticamente pelo instrumento.

9.4. Ensaio

Para a realização do ensaio, consultar o protocolo descrito nos "Test Setup" do instrumento.

A quantificação do factor V dos plasmas a testar é feita automaticamente pelo aparelho à medida que as amostras são introduzidas.

Se o resultado obtido para um determinado plasma se situar fora do intervalo de medição, o instrumento realiza automaticamente a diluição apropriada para esta amostra e repete a determinação, desde que esta funcionalidade tenha sido definida na configuração do teste (ver o "Manual de Referência").

10/ RESULTADOS

O nível de factor V (%) dos plasmas a serem testados é apresentado no painel do analisador (ver o Manual de Referência). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente. Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos intervalos indicados nas etiquetas destes controlos, verificar o funcionamento correcto de todo o sistema: condições operatórias, reagentes, calibração, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir os ensaios.

11/ LIMITAÇÕES DO MÉTODO

Os inibidores da trombina (ex. hirudina, argatroban...) presentes na amostra a testar são susceptíveis de levar a subestimação do nível de factor V desta amostra.

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

O nível plasmático do factor V, no adulto, está geralmente compreendido entre 70 e 120 % (4). No entanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais.

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

• Intervalo de medição

O intervalo de medição com o STA® - Neoplastine® CI Plus em STA® é de 3,5 a 200 % com um plasma diluído 1:10. De acordo com a norma CLSI EP06-A (8), o intervalo de medição com STA® - NeoPTmal nas famílias STA-R® e STA Compact® é de 2 a 300 % com uma adequada diluição automática do plasma.

• Precisão

Diferentes amostras foram utilizadas para os estudos laboratoriais de repetibilidade e de precisão. Os resultados obtidos com STA® - NeoPTmal em STA-R® estão descritos mais abaixo. Os estudos de precisão foram realizados de acordo com o documento da norma CLSI EP05-A3 (15).

Amostra	Repetibilidade		Precisão laboratorial	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
n	80	80	80	80
X (%)	83	33	83	33
DS (%)	2,2	0,8	5,3	2,2
CV (%)	2,7	2,3	6,4	6,8

BIBLIOGRAFIA

- SOULIER J.P., LARRIEU M.J.: "Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosages de prothrombine, de proconvertine et de procalcérine". Sang, **23**, 7, 649-659, 1992.
- CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M.: "L'hémotase. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique". Paris: Expansion scientifique, 193, 347, 1975.
- GUONNESS H., FAGERHOLM M.K.: "Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy". Acta Obstet. Gynecol. Scand., **54**, 363-367, 1975.
- ALEXANDRE P.: "Les autres déficits héréditaires d'un facteur isolé de la coagulation" in "Hématologie", NAJMAN A., VERDY E., POTRON G., ISNARD-GRIVAUX F. Paris: Edition Marketing Ellipses, 459-464, 1994.
- SAMPOU J., ARNOUX D., BOUTIERE B.: "Manuel d'hémotase". Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier, 47, 366-368, 383-384, 409-430, 1995.
- WOODHAMS B., GIRARDOT O., BLANCO M.J., COLESSE G., GOURMELIN Y.: "Stability of coagulation proteins in frozen plasma". Blood Coag. Fibrinolysis, **12**, 229-236, 2001.
- MONTEFUSCO M.C., DUGA S., ASSETTA R., MALCOVATI M., PEYVANDI F., SANTAGOSTINO E., MANUCCI P.M., TENCHINI M.L.: "Clinical and molecular characterization of 6 patients affected by severe deficiency of coagulation factor V: broadening of the mutational spectrum of factor V gene and in vitro analysis of the newly identified missense mutations". Blood, **102**, 9, 3210-3216, 2003.
- CLSI Document EP06-A: "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline", **16**, 23, 2003.
- DUGA S., ASSETTA R., TENCHINI M.L.: "Coagulation factor V". Int. J. Biochem. Cell. Biol., **36** (8), 1393-1399, 2004.
- DENNINGER M.H.: "Exploration de l'hémotase dans les maladies du foie". Rev. Fr. Lab., **387**, 35-47, 2006.
- CLSI Document GP41-A6: "Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard". Sixth edition, **27**, 26, 2007.
- ROSENDOFF A., DORFMAN D.M.: "Activated Protein C Resistance and Factor V Leiden: A Review". Arch. Pathol. Lab. Med., **131**, 866-871, 2007.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". Fifth edition, **28**, 5, 2008.
- HUANG J.N., KOEPFER M.A.: "Factor V deficiency: a concise review". Haemophilia, **14**, 1164-1169, 2008.
- CLSI Document EP05-A3: "Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline". Third Edition, **34**, 13, 2014.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
Linha Técnica
80005 Avenida da Saúde (France)
+33 (0)1 48 88 23 20
www.stago.com

Stago
Le Diagnostic Stago - les marqueurs Stago - Portugal

Figura 8 - Bula FV

**DEFICIENT VII**

Plasma imuno-depletado para o dosamento do factor VII

• Kit de 6 frascos



Art. 2017

Portugal

1/ FINALIDADE

O **STA® - Deficient VII** é um plasma utilizado para a determinação da actividade do factor VII (proconvértil) por meio de qualquer método de dosamento que implique o emprego de um plasma desprovido de factor VII (1), nos **STA-R®** e **STA Compact®**.

2/ RESUMO E EXPLICAÇÃO

- Bioquímica**

O factor VII é uma glicoproteína vitamina K dependente e cujo peso molecular corresponde, aproximadamente, a 50 000 daltons (7). Sintetizado no fígado é constituído por uma única cadeia polipeptídica (7). A taxa plasmática é de cerca de 0,50 mg/l e a semi-vida breve (t_{1/2}) é de 6 horas (7).
O factor VII (F₇ VII) forma com o factor tissular (FT) um complexo equimolecular na presença de íons de cálcio (7). No centro deste complexo, o factor VII pode ser activado em factor VIIa pelos factores Xa, XIa, XIIIa, pela trombina e pelo próprio complexo FTF-VIIa (6).
O complexo FTF-VIIa activa tanto o factor X como o factor IX (7).
O complexo FTF-VIIa é inibido pelo TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Num primeiro tempo, o TFPI liga-se ao factor Xa e, em seguida, ao complexo FTF-VIIa, formando um complexo quaternário inactivo (5). O complexo FTF-VIIa poderá ser inibido pela antitrombina na presença de heparina (5).
- Variações patológicas ou iatrogénicas**
 - Deficiência congénita em factor VII (7, 10). No caso de determinadas variantes, a taxa de actividade do factor VII dosado depende do tipo de tromboplastina utilizada (4, 7).
 - Deficiência adquirida associada à deficiência de outros factores da coagulação (2).
 - carência de fornecimento ou de absorção da vitamina K (doença hemorrágica do recém-nascido, icterícia por retenção, tratamento pelos antibióticos)
 - tratamento pelos medicamentos anti-vitamina K
 - insuficiência hepática
 - fibrose
 - coagulação intravascular disseminada (CIVD).
 - Taxas elevadas de factor VII são, por vezes, associadas a um risco acrescido de doença cardiovascular (5, 10).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

O ensaio consiste na medição do tempo de coagulação, na presença de um reagente PT da Siago, de um sistema em que todos os factores estão presentes e em excesso (fornecido pela **STA® - Deficient VII**) exceto o factor VII que é derivado da amostra a ser testada.

4/ COMPOSIÇÃO

Cada kit de **STA® - Deficient VII** contém uma etiqueta com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do kit, referência do reagente e prazo de validade.

STA® - Deficient VII, plasma humano citratado, liofilizado, desprovido de factor VII por imunoadsorção específica.

Este reagente contém proteínas de origem humana alto animal. Sempre que é necessária a utilização de plasma humano na preparação deste reagente, são utilizados métodos validados para a detecção de antígenos HIV e dos anticorpos anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da ausência de agentes infecciosos. Assim, este reagente de origem biológica deve ser manipulado com as precauções habitualmente empregues quando se trata de produto potencialmente infectioso.

5/ PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico *in vitro*. Este reagente só pode ser utilizado por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.

Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual do operador" relativo ao instrumento utilizado.

Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação dos resíduos deverá processar-se de acordo com a regulamentação local em vigor.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.

- Coher o sangue em solução de citrato trisódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue.
- Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g.
- Conservação do plasma em tubo de plástico:
 - 4 horas a 20 ± 5 °C
 - 15 dias a -20 °C (9) } se congelado rapidamente. Colocar a amostra a 1 mē a -80 °C (9) } descongelção total.

Não conservar a 2-8 °C já que o factor VII é susceptível de se activar a esta temperatura (sistema de calcinais) (3).

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

- Preparação**

Reconstituir cada frasco com 1 ml de água destilada. Deixar o reagente estabilizar, durante 30 minutos, à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, agitar ligeiramente para obter uma solução homogénea.
- Conservação**

Liofilizado: a 2-8 °C, até ao prazo de validade indicado na embalagem. Reconstituído: 8 horas em **STA-R®** e **STA Compact®**.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- STA® - Néoplastine® CI** (REF 00605, 00666), **STA® - Néoplastine® CI Plus** (REF 00606, 00667), **STA® - Néoplastine® R** (REF 00665) ou **STA® - NeopTmal** (REF 01163, 01164, 01165).
- STA® - Owen-Koller** (REF 00360).
- STA® - Unicalibrator** (REF 00675).
- STA® - System Control** [N] + [P] (REF 00678): controlos normal e anormal.
- Famílias **STA-R®** ou **STA Compact®**.
- Agitador magnético (REF 27425).
- STA® - mini Reducer** REF 00787 (**STA® - Néoplastine® CI** 9, **CI Plus** 9 ou **STA® - NeopTmal** 9) ou **STA® - maxi Reducer** REF 00801 (**STA® - Néoplastine® CI** 9, **CI Plus** 9, **R** ou **STA® - NeopTmal** 9).

Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração

A calibração é realizada por meio do **STA® - Unicalibrator**. Preparar o **STA® - Unicalibrator** e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras da etiqueta. Os diferentes pontos de gama de calibração serão automaticamente feitos pelo aparelho em **STA® - Owen-Koller** conforme a configuração do teste.

A calibração pode ser visualizada no ecrã do aparelho a partir do menu "Calibration" (ver o "Manual do Operador").

9.2. Plasmas a testar

Os plasmas a testar são utilizados em estado puro. São introduzidos no aparelho (ver o "Manual do Operador" do aparelho utilizado). As diluições em **STA® - Owen-Koller** são realizadas automaticamente pelo instrumento.

Seleccionar o(s) teste(s) a efectuar nos plasmas de paciente.

9.3. Controlos

Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Utilizar o dispositivo **STA® - System Control** [N] + [P]. Preparar estes controlos e transferir para o instrumento as informações do código de barras de cada uma das duas etiquetas. Estes controlos são utilizados em estado puro; a diluição em **STA® - Owen-Koller** é realizada automaticamente pelo aparelho.

9.4. Ensaio

Para a realização do ensaio, consulte o protocolo descrito no "Standardized Operating Procedures" do instrumento.

A quantificação do factor VII dos plasmas a testar é feita automaticamente pelo aparelho à medida que as amostras são carregadas.

Se o resultado obtido para um determinado plasma se situar fora do intervalo de medição, o instrumento realiza automaticamente a diluição apropriada para esta amostra e repete a determinação, desde que esta funcionalidade tenha sido definida na configuração do teste (ver o "Manual do Operador").

10/ RESULTADOS

O nível do factor VII das amostras testadas é visualizada em tempo real, em percentagem (%), no painel de bordo do instrumento (ver o "Manual do Operador"). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos intervalos indicados nas etiquetas destes controlos, verificar o funcionamento correcto de todo o sistema: condições operatórias, reagentes, calibração, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir os ensaios.

11/ LIMITES DO MÉTODO

Os indutores da trombose (ex. hirudine, argatroban...) presentes na amostra a testar são susceptíveis de levar a subestimação do nível de factor VII desta amostra.

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

O nível plasmático do factor VII, no adulto, está geralmente compreendido entre 55 e 170 % (6). No entanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais.

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

- Intervalo de medição**

O intervalo de medição com o **STA® - Néoplastine® CI Plus** em **STA®** é de 6 a 200 % com um plasma diluído 1:10.

De acordo com a norma CLSI EP06-A (11), o intervalo de medição com **STA® - NeopTmal** nas famílias **STA-R®** e **STA Compact®** é de 2 a 300 % com uma adequada diluição automática do plasma.
- Precisão**

Diferentes amostras foram utilizadas para os estudos laboratoriais de reprodutibilidade e de precisão. Os resultados obtidos com **STA® - NeopTmal** em **STA-R®** estão descritos mais abaixo. Os estudos de precisão foram realizados de acordo com o documento da norma CLSI EP05-A3 (12).

	Reprodutibilidade		Precisão laboratorial	
Amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 1	Amostra 2
n	80	80	80	80
X (%)	93	41	93	41
DS (%)	1,6	0,9	4,5	2,3
CV (%)	1,8	2,3	4,9	5,6

BIBLIOGRAFIA

- SOLLIER J.P., LARRIEU M.J.: "Étude analytique des temps de Quick allongés. Dosages de prothrombène, de proconvértil et de procalcine". *Sang*, **23**, 7, 549-559, 1992.
- CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M.: "Thrombolyse. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique". Paris: L'Expansion scientifique, 347, 1975.
- QUONNESS H., FAGERHOL M.K.: "Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy". *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **54**, 363-367, 1975.
- CRDZ M., BRIZARD C.P.: "Factor VII Padus 1". *Haemostasis*, **11**, 185-188, 1982.
- TAPON-BRETAUDIERE J.: "Le facteur VII, plaque tournante de la coagulation". *Option Bio*, suppl. 199, 1995.
- MARIANI G., LIBERTI G., D'ANGELO T., LO COCO L.: "Factor VII activity and antigen". *Laboratory Techniques in Thrombosis - ECAT assay procedures*. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 99-106, 1999.
- GIANELLY M., SCHVED J.F.: "Les déficits constitutionnels en facteur VII". *Hématologie*, **6**, 266-271, 2000.
- KONIGSBERG W., KIRCHHOFFER D., RIEDERER M.A., NEMERSON Y.: "The TF-VIIa complex: clinical significance, structure-function relationships and its role in signaling and metastasis". *Thromb. Haemostasis*, **66**, 757-771, 2001.
- WOODHAMS B., GIRARDOT O., BLANCO M.J., COLESSE G., GOURMELIN Y.: "Stability of coagulation proteins in frozen plasma". *Blood Coag. Fibrinolysis*, **12**, 229-236, 2001.
- PERRY D.J.: "Review - Factor VII Deficiency". *Br. J. Haematol.*, **118**, 689-700, 2002.
- CLSI Document EP06-A: "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach: Approved Guideline", **16**, 23, 2003.
- CLSI Document EP05-A3: "Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods: approved guideline". Third Edition, **34**, 13, 2014.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

ANALISTAS SIAGO S.A.S.
24000 Thionville
24000 Thionville sur Saône (France)
+33 (0)3 46 88 20 20
info@siago.com

Siago
Siago S.A.S.
24000 Thionville sur Saône (France)
+33 (0)3 46 88 20 20
info@siago.com

Figura 9 - Bula FVII

Plasma imunodepletado para a quantificação do factor VIII

• Kit de 6 frascos de 1 mL

REF 00725

15/01/2025 (20/25_PT_1)

Portugal

IVD

CE

0459

1/ FINALIDADE

STA® - Deficient VIII é um plasma utilizado para a determinação quantitativa da actividade do factor VIII no plasma humano citado para qualquer método que require a utilização de um plasma desprovido de factor VIII (1) em STA-R® e STA Compact®.

2/ RESUMO E EXPLICAÇÃO

Bioquímica do factor VIII
O factor VIII é uma glicoproteína de peso molecular de aproximadamente 280 000 daltons (10). Está presente no plasma e igualmente no soro, rins, linfócitos (11). O factor VIII circula no plasma sob forma de complexo com o factor von Willebrand F.VIII/VWF (10). Neste complexo, o factor VIII está ligado ao factor von Willebrand (VWF) por ligação não covalente (10).
O factor VIII pode ser activado pela trombina e o factor Xa (11); o factor VIII acelera a activação do factor X pelo factor IXa em presença de fosfolípidos e de cálcio (9).
Variações patológicas
- Hemofilia A
A gravidade da doença é dependente do nível de factor VIII:C (13):
o de 1 a 5 % (0,01 - 0,05 U/mL): hemofilia grave;
o de 5 a 40 % (> 0,05 - < 0,40 U/mL): hemofilia moderada;
o de 40 a 100 % (> 0,40 - < 1,0 U/mL): hemofilia atenuada.
- Doença de Willebrand: os níveis de factor VIII podem diminuir ou maior ou menor intensidade de acordo com o tipo da doença de Willebrand (14).
- O nível de factor VIII pode aumentar em certas afecções: complicações trombo-embólicas, aterosclerose coronária, insuficiência renal (10), diabetes, síndrome inflamatória...
- Níveis elevados de factor VIII são considerados factor de risco trombótico, particularmente trombose venosa (10).
- O nível de factor VIII é reduzido no caso de presença de inibidor de factor VIII (12).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

O princípio de quantificação consiste em medir, em presença de cofactores e do activador, o tempo de coagulação de um sistema onde todos os factores são presentes e em excesso (fornecidos pelo STA® - Deficient VIII) à excepção do factor VIII fornecido pela amostra testada (1, 3).

4/ COMPOSIÇÃO

Cada kit de STA® - Deficient VIII contém uma etiqueta com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do kit, referência do reagente e prazo de validade.
STA® - Deficient VIII: plasma humano citado, liofilizado, desprovido de factor VIII por imunodepleção específica. A actividade residual do factor VIII é rigorosamente inferior a 1 %. Contém actividade normal (> 50 %) de outros factores de coagulação. O fibrinogénio está também presente numa quantidade superior a 1 g/L.

5/ PRECAUÇÕES

A kit deve ser conservado a uma temperatura de 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico in vitro. Este reagente só pode ser utilizado por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.
Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual de Referência" relativo ao instrumento utilizado.
Manipular com as precauções de manuseamento os reagentes e as amostras dos pacientes.
Este reagente contém produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação deste reagente, são utilizados métodos validados para a detecção do antígeno HBs e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo no entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, este reagente de origem biológica deve ser manipulado com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.
A eliminação dos resíduos deverá processar-se de acordo com a regulamentação local em vigor.
Para um utilizador na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/EU relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico in vitro): caso, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da respetiva utilização, ocorra um incidente grave, contacte o mesmo ao fabricante e à autoridade nacional.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.
• Colher o sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M. 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue (7, 8).
• Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g. Como alternativa, centrifugar o tubo de amostra com a velocidade e o tempo necessários para produzir plasma pobre em plaquetas (< 10 000 plaquetas/μL). O processo de centrifugação alternativo deve ser validado localmente. Consultar o CLSI H21 para mais detalhes.
• Conservação do plasma em tubo de plástico: os exames devem ser efectuados o mais rapidamente possível após a recolha. No entanto, são geralmente consideradas como aceitáveis as seguintes durações de conservação:
4 horas a 20 ± 0,5 °C (8)
15 dias a -20 °C (6) e
1 mês a -80 °C (6) e
a 37 °C o tempo necessário e suficiente para a descongelação total.

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

Preparação
Reconstituir cada frasco com 1 mL de água destilada. Deixar o reagente estabilizar, durante 30 minutos, à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, agitar ligeiramente para obter uma solução homogênea.
Conservação
Liofilizado: a 2-8 °C, até ao prazo de validade indicado na embalagem. Reconstituído: 4 horas nos STA-R® e STA Compact®.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

STA® - C.K. Presa® (REF 00597), **STA® - Cephascreen®** (REF 00308, 00310) ou **STA® - PTT A** (REF 00595).
STA® - Owen-Koller (REF 00305).
STA® - CaCl₂ 0,025 M (REF 00367).
STA® - Unicalibrator (REF 00675).
STA® - System Control [N] + [P] (REF 00678): controlos normal e anormal.
STA-R® ou **STA Compact®**.
Agitador magnético (REF 26674) em caso de utilização do STA® - C.K. Presa®.
STA® - mini Reducer (REF 00797) em caso de utilização do STA® - Cephascreen® (8) ou STA® - maxi Reducer (REF 00801) em caso de utilização do STA® - Cephascreen® (8).
• Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração
A calibração é realizada por meio do STA® - Unicalibrator. Preparar o STA® - Unicalibrator e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras da etiqueta. Os diferentes pontos da gama de calibração serão automaticamente feitos pelo instrumento em STA® - Owen-Koller conforme a configuração do teste.
A calibração pode ser visualizada no ecrã do aparelho a partir do menu "Calibration" (ver o "Manual de Referência").
9.2. Plasmas a testar
Os plasmas dos pacientes são utilizados em estado puro. São introduzidos no instrumento (ver o "Manual de Referência" do aparelho utilizado). As diluições em STA® - Owen-Koller são realizadas automaticamente pelo aparelho.
Selecionar o(s) teste(s) a efectuar nos plasmas de paciente.
9.3. Controlos
Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Devem ser utilizados dois níveis de controlo diferentes. Utilizar o kit STA® - System Control [N] + [P]. Preparar estes controlos e transferir para o instrumento as informações do código de barras de cada uma das duas etiquetas. Estes controlos são utilizados em estado puro; a diluição em STA® - Owen-Koller é realizada automaticamente pelo aparelho.
9.4. Ensaio
Para a realização do ensaio, consultar o protocolo descrito nos "Test Setup" do instrumento.
Os ensaios de factor VIII dos plasmas a testar são realizados automaticamente pelo aparelho. Estes ensaios devem ser realizados imediatamente após a calibração, respeitando o tempo de estabilidade do factor VIII no plasma. É recomendado que esses ensaios sejam realizados em série.
Se o resultado obtido para um determinado plasma se situar fora do intervalo de medição, o aparelho efectua automaticamente a diluição apropriada para esta amostra e executa de novo a medição, desde que tal possibilidade esteja registada na configuração do teste (ver o "Manual de Referência").

10/ RESULTADOS

O nível do factor VIII das amostras testadas é visualizado em tempo real, em percentagem (%), no painel do analisador (ver o "Manual de Referência"). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.
Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos intervalos indicados nas etiquetas destes controlos, verificar o funcionamento correcto de todo o sistema: condições operatórias, reagentes, calibração, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir os ensaios.

11/ LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- As heparinas e os inibidores da trombina (ex. hirudine, argatroban...) presentes na amostra a testar são susceptíveis de levar a subestimação do nível de factor VIII desta amostra.
- A presença de Anticoagulante Lúpico pode subestimar os níveis de factor VIII no plasma (4).

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

O nível plasmático do factor VIII, no adulto, está geralmente compreendido entre 60 e 150 % (2). No entanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais.
Muitos factores são susceptíveis de provocar um aumento do nível de factor VIII:C:
- estropistotais, gravidez (5),
- AVK, contidolones,
- esforço físico, stress...

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

Zona de medição - Limite de detecção
Com uma diluição de plasma a testar de 1/10, o método em STA® é, com o reagente STA® - C.K. Presa®, linear até 150 % do factor VIII e o limite de detecção situa-se a 1,5 %.
Reprodutibilidade
Estudos de reprodutibilidade intra-série e inter-séries foram realizados no STA®. Os resultados obtidos são indicados no quadro seguinte:

Amostra	Reprodutibilidade intra-ensaio		Reprodutibilidade inter-ensaio	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
n	10	10	10	10
X (%)	97	41	149	50
SD (%)	6,2	1,8	12,5	3,7
CV (%)	6,4	4,3	8,4	7,5

BIBLIOGRAFIA

- SOUKIER J.P., LARRIEU M.J.: "Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B". Le Sang, 24, 3, 205-215, 1953.
- CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M.: "L'hémophilie. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique". Paris: L'Expansion scientifique, 181, 1975.
- ZACHARSKY L.R., ROSENSTEIN R.: "Standardization of the one-stage assay for factor VIII (antihemophilic factor)". Am. J. Clin. Pathol., 70, 280-286, 1978.
- BRANDT J.T., TRIPLETT D.A., ROCK W.A., BOWILL E.G., ARKIN C.F.: "Effect of lupus anticoagulants on the activated partial thromboplastin time". Arch. Pathol. Lab. Med., 115, 109-114, 1991.
- MANUEL D'HÉMOSTASE. Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier, 311-336, 379-381, 552-553, 608-609, 1995.
- WOODHAMS B., GIRARDOT O., BLANCO M.J., COLESSE G., GOURMELIN Y.: "Stability of coagulation proteins in frozen plasma". Blood Coag. Fibrinolysis, 12, 239-236, 2001.
- CLSI Document GP41-A6: "Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture: approved standard". Sixth edition, 27, 26, 2007.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline". Fifth edition, 28, 5, 2008.
- GALE A.J.: "Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis". Toxicol. Pathol., 39 (1), 273-285, 2011.
- LELAS A., GREINIX H.T., WOLFF D., EISSNER G., PAULETIC S.Z., PULANIC D.: "Von Willebrand Factor, Factor VIII, and Other Acute Phase Reactants as Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction in Chronic Oral-Versus-Venous Disease". Front. Immunol., 12, article 676756, 2021.
- PRADHAN-SUNDT T., GUADAPATI S., KAMINSKI T.W., RAGNI M.V.: "Exploring the Complex Role of Coagulation Factor VIII in Chronic Liver Disease". Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol., 12, 3, 1061-1072, 2021.
- PAI M.: "Acquired Hemophilia A". Hematol. Oncol. Clin. North Am., 35, 1131-1142, 2021.
- CADE M., MUÑOZ-GARCIA J., BABUTY A., FOUASSIER M., HEYMANN M.F., MONAHAN P.E. et al.: "FVIII at the crossroad of coagulation, bone and immune biology: Emerging evidence of biological activities beyond hemostasis". Drug Discov. Today, 27, 1, 102-116, 2022.
- SABH A., BABIKER H.M.: "Von Willebrand Disease". In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022.

Figura 10 – Bula FVIII

51

Plasma imuno-depletado para quantificação do factor IX

• Kit de 6 frascos de 1 mL

IVD

0459

Outubro 2023 (2023T07_04T_10)

Portugal

1/ FINALIDADE

O **STA® - Deficient IX** é um plasma utilizado, para a determinação quantitativa da atividade do factor IX no plasma humano obtido por meio de qualquer método que requiera a utilização de um plasma desprovido de factor IX (1), nos **STA-RH** e **STA Compact®**.

2/ RESUMO E EXPLICAÇÃO

• Bioquímica do factor IX

O factor IX é uma glicoproteína de peso molecular aproximado de 55 000 daltons, sintetizada pelo fígado. Tem uma taxa plasmática da ordem dos 3 a 5 mg/L. A síntese do factor IX biologicamente activo é vitamina K dependente (13). Esta vitamina é necessária para a carboxilação dos resíduos glutâmicos indispensáveis à fixação, em presença de Ca^{2+} , do factor IX nos fosfolipídios plaquetários ou leucocitários (5).

A activação do factor IX pode fazer-se por duas vias diferentes (13):

- o factor XIa em presença de Ca^{2+} activa o factor IX em IXa,
- o complexo factor tecidual/factor VIII activa quer o factor X, quer o factor IX.

O factor IXa forma, com os fosfolipídios, os íons de cálcio e o factor VIIIa, um complexo enzimático capaz de activar o factor X em factor Xa (10).

• Variações patológicas ou iatrogénicas

- Hemofilia B
 - A gravidade da doença depende da taxa de factor IX:C (8):
 - < 1 % (< 0,01 IU/mL): hemofilia grave,
 - 1-5 % (0,01 - 0,05 IU/mL): hemofilia moderada,
 - > 5 - < 40 % (> 0,05 - < 0,40 IU/mL): hemofilia atenuada.
 - Hipovitaminose K (2), iatrogénica com antagonistas da vitamina K (AVK) (3).
 - Alcoóles hepáticos (2).
 - No nível de factor IX é reduzido no caso de presença de inibidor de factor IX (7).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

O princípio de quantificação consiste em medir, em presença de cefalina e do activador, o tempo de coagulação de um sistema onde todos os factores são presentes e em excesso (fornecidos pelo **STA® - Deficient IX**), à excepção do factor IX fornecido pela amostra testada (1).

4/ COMPOSIÇÃO

Cada kit de **STA® - Deficient IX** contém uma bula com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do kit, referência do reagente e prazo de validade.

STA® - Deficient IX plasma humano citado, liofilizado, desprovido de factor IX por imuno-adsorção específica. A actividade residual do factor IX é rigorosamente inferior a 1 %. Contém actividade normal (> 50 %) de outros factores de coagulação. O fibrinogénio está também presente numa quantidade superior a 1 g/L.

5/ PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico *in vitro*. Estes reagentes só podem ser utilizados por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.

Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual de Referência" relativo ao instrumento utilizado.

Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes.

Este reagente contém produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação deste reagente, são utilizados métodos validados para a detecção do antígeno HbS e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, este reagente de origem biológica deve ser manipulado com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.

A eliminação dos resíduos deverá processar-se de acordo com a regulamentação local em vigor.

Para um utilizador na União Europeia e em países com um regime regulamentar idêntico (Regulamento 2017/746/UE relativo aos dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*), caso, durante a utilização deste dispositivo ou como resultado da respetiva utilização, ocorra um incidente grave, comunique o mesmo ao fabricante e a autoridade nacional.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.

- Colher o sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue (11, 12).
- Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g. Como alternativa, centrifugar o tubo de amostra com a velocidade e o tempo necessários para produzir plasma pobre em plaquetas (< 10 000 plaquetas/ μ L). O processo de centrifugação alternativo deve ser validado localmente. Consultar a CLSI HCT para mais detalhes.
- Conservação do plasma em tubo de plástico:
 - 4 horas a 20 $\pm$ 5 °C (12)
 - 15 dias a -20 °C (9) se congelado rapidamente. Colocar a 1 mês a -80 °C (9) a amostra a 37 °C o tempo necessário e suficiente para a descongelação total.

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

• Preparação

Reconstituir cada frasco com 1 mL de água destilada. Deixar o reagente estabilizar, durante 30 minutos, à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, agitar ligeiramente para obter uma solução homogênea.

• Conservação

Liofilizado: a 2-8 °C, até ao prazo de validade indicado na embalagem. Reconstituído: 4 horas nos **STA-RH** e **STA Compact®**.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- STA® - C.K. Prest®** (REF 00597), **STA® - Cephascree®** (REF 00308, 00310) ou **STA® - PTT A** (REF 00595).
- STA® - Owen-Koller** (REF 00300).
- STA® - CaCl₂ 0,025 M** (REF 00367).
- STA® - Unicallibrator** (REF 00675).
- STA® - System Control** (N) e (P) (REF 00678): controlos normal e anormal.
- STA-RH** ou **STA Compact®**.
- Agitador magnético (REF 26674) em caso de utilização do **STA® - C.K. Prest®**.
- STA® - mini Reducer** (REF 00797) em caso de utilização do **STA® - Cephascree®** (S) ou **STA® - maxi Reducer** (REF 00801) em caso de utilização do **STA® - Cephascree®** (S).

- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração

A calibração é realizada por meio do **STA® - Unicallibrator**. Preparar o **STA® - Unicallibrator** e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras da bula. Os diferentes pontos da gama de calibração serão automaticamente feitos pelo instrumento em **STA® - Owen-Koller** conforme a configuração do teste.

A calibração pode ser visualizada no ecrã do aparelho a partir do menu "Calibration" (ver o "Manual de Referência").

9.2. Plasmas a testar

Os plasmas dos pacientes são utilizados em estado puro. Basta introduzi-los no instrumento (ver o "Manual de Referência" do aparelho utilizado). As diluições em **STA® - Owen-Koller** são realizadas automaticamente pelo aparelho.

9.3. Controlos

Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Devem ser utilizados dois níveis de controlo diferentes. Utilizar o kit **STA® - System Control** (N) e (P). Preparar estes controlos e transferir para o instrumento as informações do código de barras de cada uma das duas bulas. Estes controlos são utilizados em estado puro: a diluição em **STA® - Owen-Koller** é realizada automaticamente pelo aparelho.

9.4. Ensaio

Para a realização do ensaio, consultar o protocolo descrito nos "Test Setup" do instrumento.

Os ensaios de factor IX dos plasmas a testar são realizados automaticamente pelo aparelho. Estes ensaios devem ser realizados imediatamente após a calibração, respeitando o tempo de estabilidade do factor IX no plasma. É recomendado que esses ensaios sejam realizados em série.

Se, para um determinado plasma, o resultado obtido for inferior a 5 %, o aparelho efectua automaticamente a diluição apropriada para esta amostra e executa de novo a medição, desde que tal possibilidade esteja registada na configuração do teste (ver o "Manual de Referência").

10/ RESULTADOS

O nível do factor IX das amostras testadas é visualizado em tempo real, em percentagem (%), no painel do analisador (ver o "Manual de Referência"). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos intervalos indicados nas bulas destes controlos, verificar o funcionamento correcto de todo o sistema: condições operatórias, reagentes, calibração, plasma a testar, etc. Se necessário, repetir os ensaios.

11/ LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- As heparinas e os inibidores da trombina (ex. hirudine, argatroban...) presentes na amostra a testar são susceptíveis de levar a subestimação a taxa de factor IX desta amostra.
- A presença de Anticoagulante Lípico pode subestimar os níveis de factor IX no plasma (6).

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

A taxa plasmática do factor IX, no adulto, está geralmente compreendida entre 60 e 150 % (2). No entanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais.

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

• Zona de medição - Limite de detecção

Com uma diluição do plasma a testar de 1/10, o método em **STA®** é, com o reagente **STA® - C.K. Prest®**, linear até 200 % do factor IX e o limite de detecção situa-se a 1,5 %.

• Reprodutibilidade

Estudos de reprodutibilidade intra-série e inter-séries foram realizados no **STA®**. Os resultados obtidos são indicados no quadro seguinte:

	Reprodutibilidade intra-ensaio		Reprodutibilidade inter-ensaio	
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
n	10	10	10	10
$\bar{X}$ (%)	84	35	104	44
SD (%)	5,4	2,3	12,3	5,7
CV (%)	6,4	6,5	11,8	12,9

BIBLIOGRAFIA

- SOLLIER J.P., LARRIEU M.J.: "Nouvelle méthode de diagnostic de l'hémophilie. Dosage des facteurs antihémophiliques A et B". Le Sang, **24**, 3, 205-215, 1953.
- CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M.: "L'hémophilie. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique". Paris: L'Expansion scientifique, 181, 341, 347, 1975.
- ORSTAVIK K.H., LAAKE K.: "Factor IX in warfarin treated patients". Thromb. Res., **13**, 2, 207-218, 1978.
- PANICUCCI F., SAGRIPANTI A., CONTE B., PINORI E., VISPI M., LECCHINI L.: "Characterization of heterogeneity of haemophilia B for the detection of carriers". Haemostasis, **9**, 310-318, 1980.
- SAMAMA M., CONARD J., HORELLOU M.H., LECOMTE T.: "Physiologie et exploration de l'hémophilie". Paris: Doin, 81-82, 107-108, 1990.
- BRANDT J.T., TRIPLETT D.A., ROCK W.A., BOVILL E.G., ARKIN G.F.: "Effect of lupus anticoagulants on the activated partial thromboplastin time". Arch. Pathol. Lab. Med., **115**, 109-114, 1991.
- SAMPOL J., ARNOUX D., BOUTIERE B.: "Manuel d'hémophilie". Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier, 46-48, 379-381, 1995.
- WHITE G.C., ROSENDAAL F., ALEDORT L.M., LUSHER J.M., ROTHSCHILD C., INGERSLEV J.: "Definitions in hemophilia - Recommendation of the Scientific Subcommittee on factor VIII and factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis". Thromb. Haemostasis, **85**, 560, 2001.
- WOODHAMS B., GIFFARDOT O., BLANCO M.J., COLESSE G., GOURMELIN Y.: "Stability of coagulation proteins in frozen plasmas". Blood Coag. Fibrinolysis, **12**, 229-236, 2001.
- SCHMIDT A.E., BAJAJ S.P.: "Structure-Function Relationships in Factor IX and Factor IXa". Trends Cardiovasc. Med., **13**, 1, 39-45, 2003.
- CLSI Document GP41-A6: "Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture; approved standard". Sixth edition, 27, 26, 2007.
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". Fifth edition, 28, 5, 2008.
- SMITH S.B., GALLANI D.: "Update on the physiology and pathology of factor IX activation by factor XIa". Expert Rev. Hematol., **1** (1), 67-98, 2008.

Figura 11 – Bula FIX

52

P.PORTO

ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



M

MESTRADO

DESIGNAÇÃO DO MESTRADO