

SANDRA DE SOUZA SCHILLER

**OCORRÊNCIA DE INIBIDORES DE FATOR DE COAGULAÇÃO
EM PACIENTES HEMOFÍLICOS ATENDIDOS NO
HEMOCENTRO REGIONAL DE MARINGÁ – PR**

Botucatu

2008

SANDRA DE SOUZA SCHILLER

**OCORRÊNCIA DE INIBIDORES DE FATOR DE COAGULAÇÃO
EM PACIENTES HEMOFÍLICOS ATENDIDOS NO
HEMOCENTRO REGIONAL DE MARINGÁ – PR**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Pesquisa e Desenvolvimento - Biotecnologia Médica.

Orientadora: Dra. Izoete Aparecida Thomazini Santos

Botucatu

2008

Dedico este trabalho

*Aos meus filhos, Mateus e Camila,
“você são um presente de Deus”.*

*A todos as pessoas que poderão ser
beneficiadas através deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a DEUS.

A Ele sejam dados sempre toda a honra, toda a glória e todo o louvor!

À minha mãe, I vanilde, exemplo de caráter, sempre presente, auxiliando em todos os momentos.

Ao meu pai, Pedro, "In memoriam", sempre orgulhoso de seus filhos, certamente o estaria também agora...

À minha orientadora, Dra. Izolete,
pela confiança e credibilidade em mim depositadas;
pelo respeito, ética e profissionalismo no seu tratamento;
pelos conhecimentos adquiridos.

À todos os servidores do Hemocentro Regional de Maringá, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

equipe de triagem e coleta, pela abordagem e coleta das amostras dos doadores;

equipe do Ambulatório, pela abordagem e coleta das amostras dos pacientes hemofílicos;

técnicos e auxiliares de laboratório, pelo auxílio na separação e acondicionamento das amostras, e organização do material;

aos colegas bioquímicos, pela "força" em todas as situações;

à diretoria e chefia técnica do Hemocentro Regional de Maringá, pelo apoio.

Aos meus irmãos em Cristo, que intercederam por mim a cada viagem e em todos os momentos de dificuldade,

em especial à Marta Machado, minha amiga e intercessora de todos os dias.

Ao Anderson, pelo cuidado com as "crianças" e ajuda em diversas situações.

À Daniele, que me abençoou abrindo as portas de sua casa,
"você foi um anjo que Deus colocou em minha vida, somente Ele poderá recompensá-la."

À Maira, pelo carinho e amizade,
e aos demais colegas da pós-graduação e funcionários do Hemocentro de Botucatu, pelo agradável convívio.

Aos técnicos do Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Botucatu, pela realização dos exames laboratoriais que fizeram parte deste trabalho.

À amiga Maria de Fátima, pela versão do resumo em inglês.

Ao Professor (e amigo) Eduardo, pela realização da análise estatística.

Às bibliotecárias da UNESP, Selma Maria, pela confecção da ficha catalográfica e Meire, pela assessoria com as normas de confecção do trabalho e referências bibliográficas.

Aos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Maringá, pelo consentimento na coleta de amostra para realização de parte deste trabalho.

“ Tanto sei estar humilhado, como também ser honrado; de tudo e em todas as circunstâncias já tenho experiência, tanto de fartura, como de fome; assim de abundância, como de escassez; tudo posso naquele que me fortalece. “

Apóstolo Paulo

Carta aos Filipenses 4:12-13

RESUMO

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária, relacionada ao cromossomo X, caracterizada pela deficiência de fator VIII (hemofilia A) ou fator IX (hemofilia B). As hemofilias caracterizam-se clinicamente pelo aparecimento de sangramentos e manifestações hemorrágicas que acontecem sem associação com traumas evidentes. O acompanhamento de um paciente hemofílico implica uma série de providências, além da terapêutica de substituição feita com produtos derivados do sangue que contém o fator deficiente, VIII ou IX. Atualmente, a complicação mais temida secundária ao tratamento de reposição dos hemofílicos é o aparecimento de anticorpos neutralizantes que se ligam a epítomos do fator VIII responsáveis pela formação do complexo protrombinase, causando impacto tanto no sucesso quanto no custo do tratamento destes pacientes. Os riscos para o desenvolvimento desses anticorpos são multifatoriais e envolvem fatores genéticos e ambientais. Dentre eles, parecem estar implicados a mutação genética para o fator VIII, alelos do sistema HLA, genes reguladores da produção de citocinas, o tipo e severidade da hemofilia, etnia e história familiar de presença do inibidor, idade do primeiro tratamento, modo de administração do tratamento e o tipo de concentrado de fator utilizado. Em pacientes com inibidores neutralizantes, terapias alternativas são necessárias, como uso de concentrado de complexo protrombínico ativado ou fator VII recombinante ativado. A análise laboratorial é de vital importância para o diagnóstico das hemofilias e para a escolha correta do tratamento a ser utilizado. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi disponibilizar no Hemocentro Regional de Maringá, exames de triagem e diagnóstico das hemofilias, bem como a pesquisa e dosagem de inibidores de fator VIII e IX. Para a padronização e validação das técnicas laboratoriais foram coletadas amostras de sangue de doadores do Hemocentro Regional de Maringá para a realização dos exames TTPA, TP e dosagem de fibrinogênio. As dosagens foram realizadas paralelamente no Hemocentro Regional de Maringá e Hemocentro de Botucatu. Os resultados foram comparados usando os testes estatísticos de Wilcoxon e Teste *t* para dados pareados. Foram coletadas amostras de pacientes hemofílicos cadastrados no Hemocentro Regional de Maringá para a realização das dosagens de fatores VIII e IX e pesquisa de inibidores. As técnicas foram executadas conforme descritas nos POP's. A comparação entre os resultados obtidos pelos dois serviços em relação aos valores de referência mostrou que a diferença entre os valores não mudou a interpretação dos resultados. A

análise estatística demonstrou que os valores de RNI são os mais adequados para comparar resultados de amostras idênticas em diferentes condições de trabalho. Nos pacientes cadastrados no Hemocentro Regional de Maringá foram detectados seis pacientes (35,3%) com hemofilia grave com inibidores de fator VIII. A implantação de exames laboratoriais para o estudo da hemostasia no Hemocentro Regional de Maringá contribuiu para a melhoria da qualidade do atendimento oferecido aos pacientes hemofílicos cadastrados neste serviço, proporcionando a escolha adequada do tratamento de reposição a ser utilizado.

Palavras-chave: Diagnóstico laboratorial; Fator IX; Fator VIII; Hemofilia; Inibidores; Tratamento de reposição.

ABSTRACT

Haemophilia is an inherited hemorrhagic disorder, related to the X chromosome, characterized by the deficiency of factor VIII (haemophilia A) or factor IX (haemophilia B). The haemophilias are clinically characterized by bleeding and hemorrhagic manifestations appearance which happen without evident traumatism association. The attendance of a haemophilic patient involves a series of providences, besides the replacement therapy with blood derived products which contain the deficient factor, VIII or IX. At present, the most feared complication secondary to the haemophilic replacement treatment is the appearing of neutralizing antibodies that binds to factor VIII epitopes responsible for the prothrombinase formation, causing impact either in the success or in the cost of these patients treatment. The risks of development these antibodies are multifactorials involving genetic and environmental factors. Among them, it seems to be implicated factor VIII genetic mutation, HLA system alleles, cytokine production regulating genes, haemophilia's type and severity, ethnicity and family history of inhibitors presence, age of first treatment, mode of treatment administration and type of factor concentrate used. In patients with neutralizing inhibitors, alternative therapies are necessary such as the use of activated prothrombin complex concentrate or activated recombinant factor VII. The laboratory analysis is essential for the haemophilias diagnosis and for the correct choice of treatment to be used. This way, the purpose of this study was to provide to the Hemocentro Regional de Maringá, haemophilia's screening and diagnosis assays, as well as the screening and determination of factor VIII and IX inhibitors. For the standardization and validation of the laboratory techniques donors blood samples from the Hemocentro Regional de Maringá were collected in order to perform the APTT (Activated Partial Thromboplastin Time) test, PT (Prothrombin Time) test and fibrinogen determination. The assays were performed in parallel at the Hemocentro Regional de Maringá and Hemocentro de Botucatu. The results were compared using the Wilcoxon and *t* Test statistics tests for paired data. Samples of haemophilic patients registered at the Hemocentro Regional de Maringá were collected in order to perform the determination of factors VIII and IX and inhibitors screening. The techniques were performed according to the Standard Operating Procedure. The comparison between obtained results by both services in relation to the reference range showed that the difference between the values did not

change the interpretation of the results. The statistical analysis showed that International Normalized Ratio values are the most suitable to compare the results of identical samples in different work conditions. Among the patients registered in the Hemocentro Regional de Maringá six patients (35,3%) with severe haemophilia were detected with factor VIII inhibitors. The implantation of laboratory assays to study haemostasis in the Hemocentro Regional de Maringá contributed to the improvement of the attendance quality offered to the haemophilic patients registered in this service, providing the suitable choice of the replacement therapy to be used.

Keywords: Laboratory diagnosis; Factor IX; Factor VIII; Haemophilia; Inhibitors; Replacement therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS

FVIII = fator VIII

FIX = fator IX

HIV = vírus da imunodeficiência humana

IgG = imunoglobulina G

IgE = imunoglobulina E

HLA = human leucocyte antigen

CCPA = concentrado de complexo protrombínico ativado

rFVIIa = concentrado de FVII recombinante ativado

CD = cluster differentiation

TTPA = tempo de tromboplastina parcial ativada

TP = tempo de protrombina

CaCl₂ = cloreto de cálcio

rpm = rotações por minuto

RNI = razão normatizada internacional

ISI = índice de sensibilidade internacional

mg/dl = miligramas por decilitro

UB/ml = unidades Bethesda por mililitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
MATERIAL E MÉTODO.....	16
IMPLANTAÇÃO DO LABORATÓRIO DE HEMOSTASIA.....	16
ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL DOS PACIENTES	
HEMOFÍLICOS.....	18
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
IMPLANTAÇÃO DO LABORATÓRIO DE HEMOSTASIA.....	19
ACOMPANHAMENTO LABORATORIAL DOS PACIENTES	
HEMOFÍLICOS.....	27
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	37
ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	38
ANEXO B – POP Tempo de Protrombina (TP).....	41
ANEXO C – POP Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA).....	44
ANEXO D – POP Pesquisa de inibidor – teste de mistura.....	47
ANEXO E – POP Dosagem de fator VIII e IX.....	50
ANEXO F – POP Dosagem de inibidor – método Bethesda.....	53
ANEXO G – POP Dosagem de fibrinogênio.....	56
ANEXO H – POP Tempo de sangramento – método de Ivy.....	59
ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética.....	61

INTRODUÇÃO

A hemofilia é uma doença hemorrágica hereditária, caracterizada pela deficiência de Fator VIII (hemofilia A) ou Fator IX (hemofilia B) ^{1,2}. É a coagulopatia hereditária mais comum em humanos, e ocorre em aproximadamente 10-20 em 100.000 nascidos vivos do sexo masculino ^{2,3}. A transmissão se faz através do cromossomo X, manifestando-se praticamente nos homens, sendo as mulheres portadoras assintomáticas ¹. A expressão fenotípica da hemofilia em mulheres é um evento raro ^{4,5}.

A hemofilia A é a mais freqüente, totalizando 85% dos casos ¹. A prevalência da hemofilia A varia de 1/20.000 a 1/10.000 indivíduos, enquanto para a hemofilia B é de 1/30.000 a 1/50.000 ⁶.

As hemofilias caracterizam-se clinicamente pelo aparecimento de sangramentos, que ocorrem após traumatismos de intensidade mínima. Contudo, muitas manifestações hemorrágicas acontecem sem associação com traumas evidentes. A freqüência e a gravidade do quadro hemorrágico estão geralmente relacionadas com as concentrações plasmáticas do fator deficiente, de modo que a gravidade da doença é diretamente proporcional ao grau de deficiência do fator ⁶. Desta forma, a quantificação do fator deficiente torna-se indispensável para o correto acompanhamento e tratamento da doença.

Os pacientes com deficiências graves apresentam manifestações hemorrágicas de repetição e hemartroses graves, as quais, quando não tratadas adequadamente, evoluem para artropatias crônicas e incapacitantes. Outras complicações que podem acometer os pacientes hemofílicos são os hematomas musculares, hematúria, sangramento gastro-intestinal, cistos hemorrágicos, complicações neurológicas e outros tipos de sangramentos como epistaxes e sangramentos de mucosas ⁶.

O acompanhamento de um paciente hemofílico implica uma série de providências, além da simples terapêutica de substituição feita com produtos derivados do sangue, que devem conter o fator deficiente VIII ou IX, conforme o caso ⁶.

Ao longo da história, a complicação mais temida, secundária ao tratamento de reposição dos hemofílicos, é a transmissão dos vírus da hepatite e do HIV. Outras complicações são a depressão da imunidade celular e o

desenvolvimento de fenômenos tromboembólicos¹. Atualmente o aparecimento de anticorpos neutralizantes que se ligam a epítomos do FVIII ^{1,7,8} tem tido um importante impacto tanto no sucesso quanto no custo do tratamento desses pacientes ⁹, e é considerada a mais significativa complicação no tratamento da hemofilia ¹⁰.

O uso repetido de FVIII leva alguns portadores da hemofilia a desenvolver anticorpos anti-fator VIII, os chamados inibidores. Os hemofílicos B quase nunca desenvolvem inibidores de FIX, pois as preparações deste fator são pouco imunogênicas ¹.

Inibidores são assim chamados por inibirem a atividade tanto dos fatores endógenos quanto dos FVIII e FIX exógenos administrados como terapia de reposição ^{7,11}.

Inibidores são anticorpos policlonais IgG ^{7,11}, freqüentemente IgG4, dirigidos contra epítomos do FVIII envolvidos na interação deste com outros fatores da coagulação na formação do complexo protrombinase. Relato recente demonstrou a presença de anticorpos Ig-E anti-FVIII mediando um episódio de reação anafilática à administração de FVIII purificado de plasma humano e FVIII recombinante ¹².

Os inibidores não ocorrem em todos os pacientes com hemofilia A, embora não seja possível determinar os riscos para o desenvolvimento do inibidor. Algumas questões críticas são levantadas para compreender porque somente alguns hemofílicos desenvolvem inibidores, e se é possível prever o desenvolvimento de inibidor em um indivíduo ¹³.

Os riscos para o desenvolvimento desses anticorpos parecem estar relacionados tanto a fatores inerentes ao paciente quanto ao tipo de tratamento realizado ¹¹. As causas são multifatoriais e envolvem fatores genéticos e ambientais. Dentre elas, parecem estar implicadas a mutação genética para o FVIII, alelos de classe I e II do sistema HLA, genes reguladores da produção de citocinas e da resposta imune, o tipo e severidade da hemofilia, etnia e história familiar de presença do inibidor ^{14,15,16,17,18,19}. O genótipo do FVIII parece representar a maior influência para o desenvolvimento de inibidores, sendo a inversão no intron 22 a mais envolvida, com uma prevalência de inibidor de cerca de 21%. Em dois estudos realizados em pacientes hemofílicos com inversão no intron 22, foram pesquisados o genótipo HLA desses indivíduos, e os alelos de classe II DQA0102, DQB0602 e DR15 foram encontrados com mais freqüência em pacientes com inibidores do que

sem. Quando comparada a influência da raça na formação dos inibidores, Scharrer e col²⁰ demonstraram que a incidência de inibidores com hemofilia grave foi o dobro em africanos quando comparados com brancos. Entre irmãos, a incidência de inibidores é de 50%, enquanto que em não irmãos é de 09%¹⁵. Fatores de risco não inerentes têm sido investigados, incluindo idade do primeiro tratamento, tipo e intensidade do tratamento e modo de administração²¹. Estudos recentes sugerem que o risco de aparecimento dos inibidores também esteja associado com o tipo de concentrado de fator utilizado²². A influência do tipo de concentrado de FVIII em pacientes com hemofilia A grave ainda é controversa. Estudos prospectivos comparando a influência do uso de concentrado de FVIII derivado de plasma e concentrado de FVIII recombinante (FVIIIr) no desenvolvimento de inibidores, demonstrou um risco 2,5-3,0 vezes maior com o uso do FVIIIr em pacientes não tratados previamente²³, mas não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tratamentos em pacientes previamente tratados²⁴.

Inibidores transitórios usualmente aparecem em baixos níveis, e desaparecem espontaneamente com a continuação do tratamento de reposição dentro de seis meses após a ocorrência²⁵.

O desenvolvimento de inibidores com capacidade de neutralizar a função do FVIII ocorre em 20 a 30% de pacientes com hemofilia A grave tratados com terapia de reposição. Raramente inibidores de FVIII podem aparecer em pacientes com hemofilia leve ou moderada^{9,15,16,21,22} e em geral os episódios de sangramento são semelhantes aos da hemofilia adquirida^{9,26}.

A incidência de inibidores na hemofilia B é muito menor que na hemofilia A, podendo ser considerado um evento incomum, variando entre 3-5% dos pacientes, com uma incidência cumulativa de até 7,5%^{16,22,27,28}. As complicações do aparecimento de inibidores de FIX em pacientes com hemofilia B são o desenvolvimento de síndrome nefrótica e/ou reações alérgicas sistêmicas anafiláticas ou anafilactóides aos concentrados de FIX^{11,22,28}.

A presença de inibidores em pacientes com hemofilia é suspeitada quando o paciente não responde ao tratamento padrão, sendo que os sangramentos espontâneos ocorrem com mais frequência em pacientes com inibidores do que sem²².

Nos pacientes com inibidores neutralizantes de fator, terapias alternativas são necessárias, como uso de FVIII porcino, CCPA ativado ou rFVIIa²⁹. O

tratamento com CCPA ou rFVIIa é mais efetivo, porém mais caro que o concentrado de FVIII usual ²².

As sérias consequências da presença de inibidor de FVIII em pacientes com hemofilia A têm estimulado a pesquisa para eliminar a presença do inibidor através da indução de tolerância imunológica. Tentativas para induzir tolerância imunológica envolvem o uso de drogas imunossupressoras, em particular esteróides, ciclofosfamida e azatioprina ³⁰, a utilização de infusão contínua de FVIII em altas doses ³¹ e recentemente protocolos para a utilização do anticorpo monoclonal anti-CD20 (rituximab) tem sido experimentados com sucesso ^{22,32}.

A triagem para a pesquisa de inibidores de FVIII e FIX pode ser feita simplesmente pela diluição 1:1 do plasma do paciente com *pool* de plasma normal e realização do TTPA, onde, na presença de inibidores neutralizantes, não ocorre a correção do teste pela presença do plasma normal ³³. Desde a primeira publicação por Kasper e col. em 1975, o ensaio Bethesda tem sido o método laboratorial mais utilizado para a quantificação dos anticorpos inibidores de FVIII e FIX no plasma ^{11,16}. Por definição, 1 (uma) unidade Bethesda (BU) corresponde à quantidade de anticorpos que neutraliza 50% do FVIII ou FIX em 1 (um) ml de plasma normal ¹⁶. O ensaio Bethesda revela exclusivamente inibidores de FVIII que utilizam sua estrutura molecular como mecanismo neutralizante. Outros anticorpos anti-FVIII são formados em resposta a terapêutica de administração de FVIII exógeno que reconhecem domínios do FVIII não relevantes para a sua atividade pró-coagulante ¹⁵. Em 1995, Verbruggen e colaboradores desenvolveram duas modificações do ensaio Bethesda – o ensaio Nijmegen ³⁴ – que tem aumentado a especificidade e sensibilidade do teste na presença de inibidores de baixo título ¹⁶. Protocolos de diagnóstico e dosagem de inibidores recomendam a confirmação da dosagem pelo método Bethesda pelo ensaio modificado de Nijmegen ²⁵. Tanto o método de Bethesda quanto as modificações de Oxford e Nijmegen consistem numa medida indireta dos inibidores, baseados em que uma conhecida concentração de FVIII é neutralizada após incubação a 37°C, pela presença do inibidor no plasma do paciente ²². Recentemente outros ensaios para triagem e quantificação de inibidores têm sido descritos, baseados em métodos imunoenzimáticos ²² e estudos tem sido realizados a fim de comparar o desempenho deste último em relação aos ensaios tradicionais ⁸.

A análise laboratorial para o diagnóstico e acompanhamento das hemofilias é de vital importância, visto que disso depende a escolha correta do tratamento a ser utilizado³⁵.

O Hemocentro Regional de Maringá está ligado à Hemorrede pública do estado do Paraná e atende a uma região que compreende 30 municípios, com uma população de 663.083 habitantes. Atende, em média, 1086 candidatos à doação mensalmente, e transfunde cerca de 533 hemocomponentes/mês em pacientes de hospitais de Maringá e região. Realiza transfusões a nível ambulatorial e coordena as ações de hemovigilância no Hospital Universitário Regional de Maringá, ao qual está vinculado. O Ambulatório de Hematologia atende pacientes portadores de anemias e coagulopatias, dentre estas, portadores de hemofilia A, hemofilia B e Doença de Von Willebrand, totalizando cerca de 80 pacientes cadastrados oriundos de Maringá e municípios da região. O Hemocentro dispõe de estoques de concentrados de fatores da coagulação para o tratamento de tais pacientes, porém não oferece suporte laboratorial para o diagnóstico e acompanhamento dos mesmos. Vale ressaltar que em nossa região, nenhum outro laboratório da rede pública dispõe deste serviço, sendo necessário o deslocamento dos pacientes até a cidade de Curitiba – distante 450 km de Maringá - para a realização de exames laboratoriais.

Deste modo, o objetivo deste estudo foi disponibilizar no Hemocentro Regional de Maringá, exames de triagem e diagnóstico das coagulopatias, em particular das hemofilias, e o acompanhamento dos pacientes hemofílicos atendidos no serviço quanto à pesquisa e dosagem de inibidores de FVIII e FIX.

MATERIAL E MÉTODOS

Implantação do Laboratório de Hemostasia

Para determinar o número de amostras para validação das técnicas laboratoriais, utilizou-se o cálculo do tamanho da amostra para proporção populacional, com erro = 10%, nível de confiança = 95% e significância = 5%, onde $n = 96$. As amostras foram coletadas de doadores de sangue do Hemocentro Regional de Maringá, de ambos os sexos e qualquer idade dentro dos limites

aceitáveis para a doação, após aprovação do candidato à doação pela triagem clínica e hematológica, e ciência e anuência dos mesmos através de assinatura do termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

Foram elaborados Manuais de Procedimento Operacional Padrão (POP's), de acordo com o modelo utilizado no Hemocentro Regional de Maringá, para todas as técnicas a serem implantadas neste serviço (Anexos B-H).

As amostras foram coletadas durante o procedimento da doação de sangue, no momento em que são coletadas as amostras para os exames sorológicos e imunohematológicos. Para cada doador foram obtidas duas amostras de sangue em tubo à vácuo com anticoagulante citrato de sódio a 3,2% (Vacutainer®, BD). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 10°C, para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). De cada tubo primário foram retirados o mesmo volume de plasma não ultrapassando os 2/3 superiores do PPP, para a preparação de um *pool* e separação em duas alíquotas em tubos tipo Eppendorf, congeladas a -80°C.

Uma das alíquotas foi enviada ao Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Botucatu, acondicionada em gelo seco e a outra foi utilizada para os testes no Hemocentro Regional de Maringá. Foram realizados paralelamente no Hemocentro de Botucatu e Hemocentro Regional de Maringá os testes TP, TTPA e Dosagem de Fibrinogênio.

No Hemocentro Regional de Maringá os exames foram realizados em equipamento semi-automático Fibrintimer II (DADE Behring®). Para a realização do TP, utilizou-se o reagente Tromborel® S (DADE Behring®), para o TTPA utilizaram-se os reagentes Actin® e CaCl₂ (DADE Behring®), e para a Dosagem de Fibrinogênio o kit utilizado foi o Multifibren* U (DADE Behring®). Para a realização das curvas de calibração do TP e Dosagem de Fibrinogênio utilizou-se o Plasma Humano Padrão (DADE Behring®) e em cada bateria de exames foi utilizado como controle o Plasma de Controle Normal (DADE Behring®). As técnicas foram executadas conforme instruções do fabricante e descritas nos POPs.

No Hemocentro de Botucatu os exames foram realizados em equipamento automatizado Sysmex CA-1500 (DADE Behring®). Para a realização do TP, utilizou-se o reagente Tromborel® S (DADE Behring®), para o TTPA utilizaram-se os reagentes Actin® e CaCl₂ (DADE Behring®), e para a Dosagem de Fibrinogênio o kit utilizado foi o Multifibren* U (DADE Behring®). Para a realização

das curvas de calibração do TP e Dosagem de Fibrinogênio utilizou-se o Plasma Humano Padrão (DADE Behring ®) e em cada bateria de exames foi utilizado como controle o Plasma de Controle Normal (DADE Behring ®). As técnicas foram executadas conforme instruções do fabricante e descritas nos POPs.

Para a comparação dos resultados foram utilizados os testes estatísticos de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk para a verificação da normalidade dos dados e os teste *t* de Student e Wilcoxon para dados pareados como teste de hipótese ³⁶.

Acompanhamento laboratorial dos pacientes hemofílicos

Os pacientes constantes no cadastro de coagulopatias do Hemocentro Regional de Maringá, como portadores de hemofilia A ou hemofilia B, compareceram ao serviço mediante convocação via telefone ou correio para atualização de cadastro e/ou coleta de amostra para a realização dos exames. As amostras de sangue dos pacientes foram coletadas após ciência e anuência dos mesmos através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e/ou solicitação de exames preenchida pelo médico do Ambulatório de Hematologia do Hemocentro Regional de Maringá.

De cada paciente foram coletadas duas amostras de sangue em tubo à vácuo com anticoagulante citrato de sódio a 3,2% (Vacutainer ®, BD). As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos a 10°C, para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). De cada tubo primário foram retirados o mesmo volume de plasma não ultrapassando os 2/3 superiores do PPP, para a preparação de um *pool* e separação em duas a quatro alíquotas em tubos tipo Eppendorf, congeladas a -80°C.

Para cada paciente foram realizados os seguintes exames: TTPA, pesquisa de inibidor pelo teste de mistura e dosagem do FVIII ou IX. Para os pacientes com pesquisa de inibidor positiva, foi realizada a dosagem do inibidor pelo método de Bethesda.

Os exames foram realizados em equipamento semi-automático Fibrintimer II (DADE Behring ®). Para a realização do TTPA e teste de mistura utilizaram-se os reagentes Actin® e CaCl₂ (DADE Behring ®), e para a dosagem de FVIII ou FIX, além dos reagentes para o TTPA utilizou-se também Plasma Deficiente

em FVIII ou Plasma Deficiente em FIX (DADE Behring ®). Para a realização das curvas de calibração para dosagem de FVIII e FIX utilizou-se o Plasma Humano Padrão (DADE Behring ®) e em cada bateria de exames foi utilizado como controle o Plasma de Controle Normal (DADE Behring ®). As técnicas foram executadas conforme instruções do fabricante e descritas nos POPs.

Este projeto foi submetido ao Comitê Permanente de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Maringá, obtendo aprovação em 01/09/2006 (cópia em anexo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Implantação do Laboratório de Hemostasia

Para a validação das técnicas a serem implantadas foram coletadas 153 amostras de doadores de sangue para obtenção do n de 96 amostras. Várias amostras foram perdidas, principalmente devido à falhas no procedimento de coleta, em relação à proporção do volume de sangue anticoagulante. Algumas amostras intensamente lipemicas não possibilitaram a leitura em algumas reações. As amostras foram analisadas paralelamente no Hemocentro de Maringá e Hemocentro de Botucatu – Laboratório de Hemostasia. Os resultados do TTPA foram expressos em R – razão entre o tempo de coagulação de um *pool* de plasma normal e o tempo de coagulação do plasma em análise. O *pool* de plasma normal utilizado pelos dois hemocentros foi o mesmo. O TP foi expresso em porcentagem de atividade de protrombina, calculada através da relação estabelecida entre o tempo de coagulação e a porcentagem de atividade da protrombina em uma curva de calibração realizada com plasma humano normal conhecido. O valor do RNI é calculado a partir da atividade de protrombina e do ISI do reagente utilizado. Os resultados da dosagem de fibrinogênio foram expressos em mg/dl, também a partir da conversão do tempo de coagulação pela curva de calibração.

A Tabela 1 mostra os resultados dos testes estatísticos aplicados para verificação da normalidade das amostras.

TABELA 1 – Testes de normalidade segundo Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk

	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
	n	p	N	p
TTPA1	119	0,200	119	0,543
TTPA2	119	0,200	119	0,017
TP RNI1	96	0,021	96	0,025
TP RNI2	96	,0083	96	0,216
TP%1	96	0,001	96	0,003
TP%2	96	0,100	96	0,190
FIB1	107	0,200	107	0,301
FIB2	107	0,057	107	0,204

TTPA1, TP RNI1, TP%1 e FIB1:resultados obtidos no Hemocentro de Maringá.

TTPA2, TP RNI2, TP%2 e FIB2:resultados obtidos no Hemocentro de Botucatu.

Para os resultados de TTPA, TP RNI e TP%, os valores de p não foram maiores que 0,05 em todas as análises, e por isso não são considerados normais. Para dados pareados não normais, foi utilizado para a verificação da hipótese o Teste de Wilcoxon. Os resultados da dosagem de fibrinogênio apresentaram valores de p maiores que 0,05 em todas as análises e para dados pareados normais foi utilizado o teste t de Student. Os resultados das análises estatísticas estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 - Comparação entre os resultados obtidos no Hemocentro Regional de Maringá e Hemocentro de Botucatu – Laboratório de Hemostasia pelo teste de Wilcoxon e Teste t de Student

	Teste de Wilcoxon			Teste t de Student
	TTPA2 - TTPA1	TP RNI2 - TP RNI1	TP%2 - TP%1	FIB1 - FIB2
t				-5,713
Z	-5,120	-0,205	-4,954	
p	0,000	0,838	0,000	0,000

TTPA1, TP RNI1, TP%1 e FIB1:resultados obtidos no Hemocentro de Maringá.

TTPA2, TP RNI2, TP%2 e FIB2:resultados obtidos no Hemocentro de Botucatu.

A Tabela 2 mostra os valores de $p < 0,05$ para os resultados de TTPA, TP% e dosagem de fibrinogênio, significando que os resultados são estatisticamente diferentes.

Os exames foram realizados paralelamente no Hemocentro de Maringá e Hemocentro de Botucatu – Laboratório de Hemostasia, utilizando-se o método coagulométrico, onde se mede o tempo de formação da fibrina no plasma citratado após a adição de um reagente ativador do mecanismo de coagulação. No entanto, as técnicas utilizadas foram diferentes. No Hemocentro de Maringá, utilizou-se a técnica semi-automatizada pelo equipamento Fibrintimer II (DADE Behring®), onde a leitura do tempo de formação do coágulo de fibrina é automática, porém a pipetagem do plasma e dos reagentes é manual. No Hemocentro de Botucatu o equipamento utilizado foi o Sysmex CA-1500 (DADE Behring®), que é totalmente automatizado. A interferência da pipetagem manual em uma das técnicas pode ser um dos fatores que determina a diferença entre os resultados.

Os resultados então foram comparados em relação aos valores de referência utilizados pelo Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Botucatu, neste trabalho considerado o laboratório de referência, e os resultados estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3.

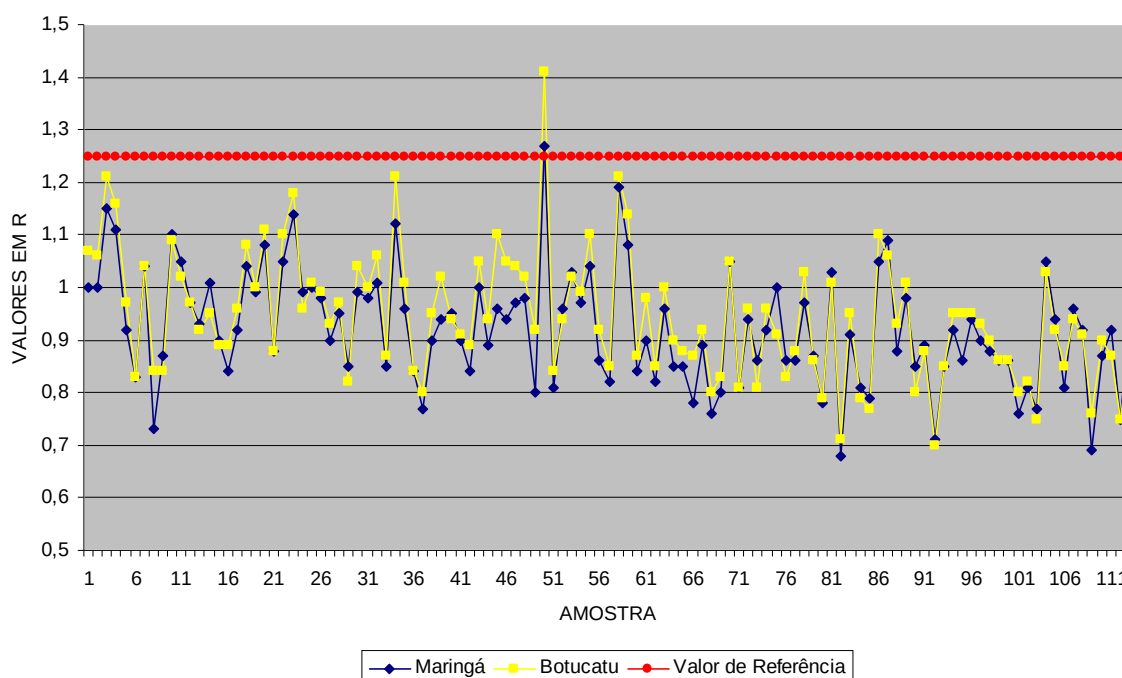


FIGURA 1 - Comparação entre os resultados de TTPA – valores expressos em R – obtidos no Hemocentro Regional de Maringá e Hemocentro de Botucatu – Laboratório de Hemostasia, em relação aos valores de referência

A Figura 1 mostra os resultados de TTPA obtidos nos dois serviços comparados com o valor de referência utilizado pelo laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Botucatu, de $R < 1,25$. Podemos observar que embora vários pontos apresentem uma diferença significativa entre os valores de R, um único ponto ficou acima do valor de referência, e a alteração foi concordante em ambos os serviços. Considerando que as especificações do reagente não apresentam valor de referência para R e os resultados do Hemocentro Regional de Maringá foram coerentes com o valor padronizado pelo Hemocentro de Botucatu, adotamos como valor de referência em nosso serviço o valor de $R < 1,25$.

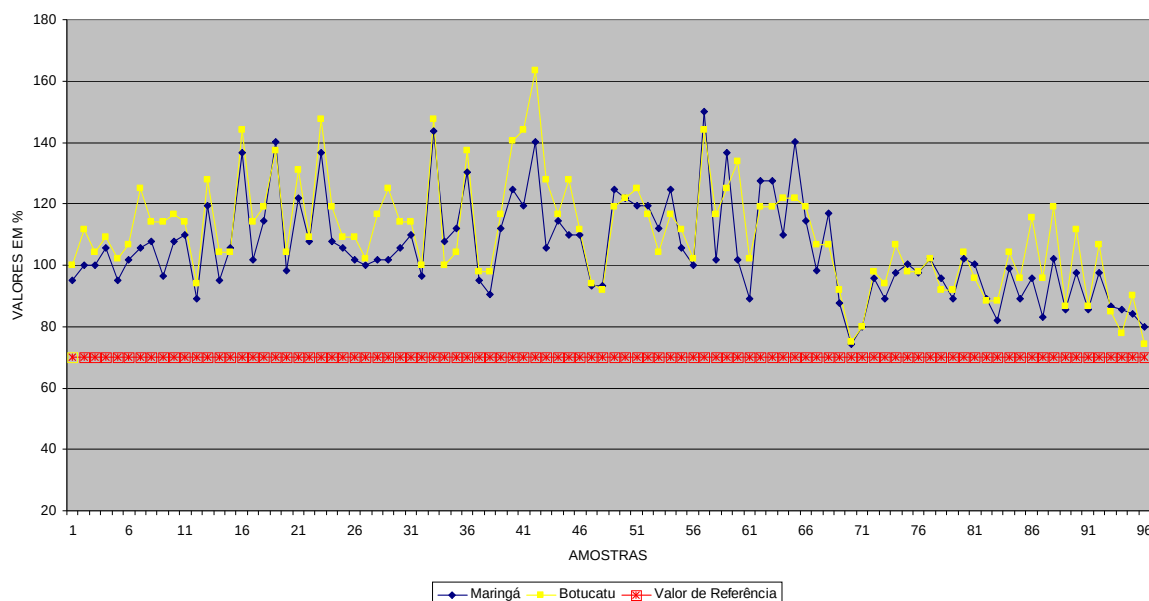


FIGURA 2 - Comparação entre os resultados de TP – valores expressos em % – obtidos no Hemocentro Regional de Maringá e Hemocentro de Botucatu – Laboratório de Hemostasia, em relação aos valores de referência

A Figura 2 mostra os resultados de TP expressos em atividade de protrombina comparados com o valor de referência de TP $> 70\%$, valor este tanto padronizado pelo Hemocentro de Botucatu quanto o descrito nas especificações do reagente. Comparando os valores encontrados pelos dois serviços com o valor de referência, observamos que mesmo havendo diferença entre os valores, 100% das amostras coincidiram no que diz respeito ao se encontrarem dentro da faixa de normalidade. Além disso, observando o comportamento do gráfico, percebemos

uma tendência dos resultados obtidos nos dois serviços acompanharem as variações de valores entre as amostras.

A principal dificuldade no uso do TP para o controle terapêutico dos anticoagulantes orais é o grau de variação na sensibilidade apresentada por diferentes tromboplastinas comerciais à redução dos fatores de coagulação induzida pela medicação, sensibilidade esta que depende do método de preparação deste reagente. Assim, este problema despertou os estudiosos para a necessidade de se criar um método de padronização do TP, diminuindo-se a variação interlaboratorial³⁷. Para isso, foi necessário estabelecer um modelo de calibração das tromboplastinas, onde o primeiro lote obtido de cérebro humano como referência internacional teve índice de sensibilidade igual a 1,0. Desde então novos lotes de tromboplastina tem sido desenvolvidos e através de plasma padrão, a sensibilidade à redução dos fatores de coagulação é testada para cada tromboplastina produzida, e acha-se um valor numérico denominado Índice de Sensibilidade Internacional (ISI). Assim, em 1983, A Organização Mundial de Saúde propôs um modelo de padronização do resultado de TP, a Razão Normalizada Internacional (RNI), que é calculada através da relação entre os valores de TP do paciente e do controle normal (R) e eleva o valor de R ao ISI.

Dois plasmas de igual atividade poderão ter com cada tromboplastina diferentes R, mas terão idênticos RNI. Isto pôde ser observado quando comparamos os resultados de RNI obtidos pelo Hemocentro de Maringá e Hemocentro de Botucatu - Laboratório de Hemostasia (Tabela 2). O teste estatístico mostrou que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos entre os dois serviços ($p > 0,05$).

Isto demonstra que as condições de trabalho para o TP estão satisfatórias apesar da diferença que houve entre os resultados de TP expressos em porcentagem de atividade.

A Figura 3 mostra a variação entre os resultados TP expressos em RNI.

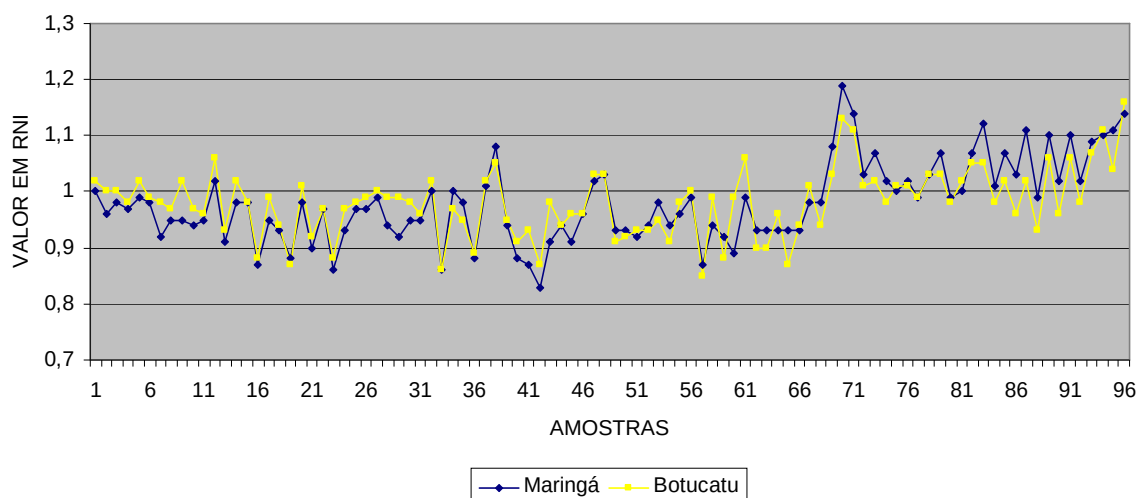


FIGURA 3 - Comparação entre os resultados de TP – valores expressos em RNI – obtidos no Hemocentro Regional de Maringá e Hemocentro de Botucatu – Laboratório de Hemostasia, em relação aos valores de referência

A Figura 4 mostra os resultados da dosagem de fibrinogênio contra os valores de referência estabelecidos pelo fabricante e os valores utilizados pelo Laboratório de Hemostasia de Botucatu.

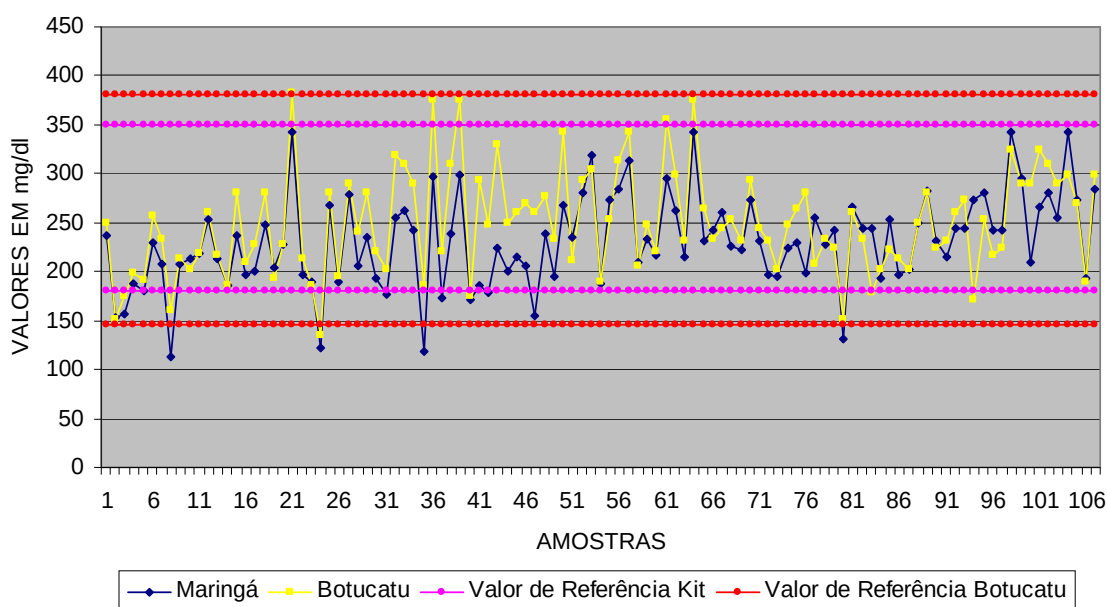


FIGURA 4 - Comparação entre os resultados de dosagem de fibrinogênio – valores expressos em mg/dl – obtidos no Hemocentro Regional de Maringá e Hemocentro de Botucatu – Laboratório de Hemostasia, em relação aos valores de referência

Considerando os valores de referência do fabricante, 12 (11,2%) amostras apresentaram discordância em relação ao intervalo de referência, sendo

que 7 (6,5%) discordaram entre valores normais e acima do intervalo de referência e 5 (4,7%) discordaram entre valores normais e abaixo do intervalo de referência. Quando comparamos os resultados com o intervalo de referência utilizado pelo Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Botucatu, apenas 2 (1,9%) amostras apresentaram resultados discordantes em relação ao intervalo de referência, sendo 1 (0,9%) entre valor normal e acima e 1 (0,9%) entre valor normal e abaixo do intervalo de referência. Considerando que os valores de referência expressos na bula dos kits diagnósticos geralmente expressam valores obtidos em uma população específica com uma técnica determinada, o ideal é que cada serviço estabeleça seus valores de referência de acordo com sua população e as condições de trabalho locais. Considerando que para o estudo, utilizou-se uma população normal (doadores de sangue), e que a variação encontrada para a dosagem de fibrinogênio assemelhou-se mais quando comparada com os valores de referência do Hemocentro de Botucatu, sugerimos a utilização destes valores também para a população de Maringá e região.

Vale ressaltar que um resultado de um exame laboratorial nunca deve ser interpretado isoladamente, mas sim em conjunto com a clínica apresentada pelo paciente. No caso específico dos exames para a avaliação da hemostasia, muitos fatores interferem na qualidade do resultado final. Fatores pré-analíticos como tempo de coleta; intensidade do garroteamento; transferência de tecido para o tubo de amostra; tipo de punção: preenchimento correto do volume de sangue em relação ao anticoagulante; mistura do sangue ao anticoagulante; centrifugação e separação do PPP; tempo e temperatura de espera antes da realização do exame, são determinantes no resultado da análise laboratorial. Condições inerentes ao indivíduo, como o valor do hematócrito, podem alterar os resultados do TP e do TTPA, sendo necessário ajustar o volume do anticoagulante quando o hematócrito estiver abaixo ou acima do valor de referência. Fatores analíticos como calibração de pipetas e equipamentos, reconstituição adequada dos reagentes, revisão periódica das curvas de calibração e uso de controles em todas as baterias de exames devem ser observados sempre a fim de evitar erros e falsos resultados ³⁸.

Deste modo consideramos que embora os testes estatísticos apresentassem valores estatisticamente diferentes para os resultados de TTPA, TP em porcentagem de atividade da protrombina e dosagem de fibrinogênio, consideramos satisfatórios os resultados encontrados pelo Hemocentro de Maringá

quando comparados com o Laboratório de Hemostasia do Hemocentro de Botucatu, nesta análise considerado o laboratório de referência, visto que em 100% dos resultados de TTPA, 100% dos resultados de TP expressos porcentagem de atividade da protrombina e RNI, e 98,1% dos resultados de dosagem de fibrinogênio, a diferença de resultados encontrada entre os dois serviços não altera a sua interpretação no que diz respeito à comparação com os intervalos de referência.

Para estabelecer o valor de referência do teste de mistura para pesquisa de inibidores (R , onde $R = \text{TTPA pós-incubação} / \text{TTPA pré-incubação}$), calculou-se a média mais um desvio padrão (DP) das amostras dos doadores de sangue. Considerando a distribuição de Gauss, a média mais dois desvios padrão corresponde ao intervalo onde se encontram 95% dos valores encontrados, sendo este o cálculo freqüentemente utilizado para se estabelecer intervalos de valores de referência ³⁹. No caso da pesquisa de inibidores, esta é positiva quando o valor se encontra fora do intervalo de referência, isto é, acima do R . Em pacientes com baixos títulos de inibidores, a razão pode se encontrar muito próxima da média obtida pelo teste de mistura em indivíduos normais, e a utilização de um intervalo de referência mais distante da média poderia apresentar resultados falso negativos nestes casos. Isto pôde ser observado na pesquisa de inibidores em dois pacientes hemofílicos, cujo R ficou próximo da média dos doadores mais 1 DP, e a dosagem confirmou a presença de inibidor de baixo título (1 UB/ml). Deste modo, preferiu-se estabelecer o valor de R sendo a média encontrada no teste de mistura das amostras de doadores de sangue mais um desvio padrão, aumentando a sensibilidade do teste e evitando resultados falso-negativos. O R estabelecido foi então de 1,38.

A Figura 5 mostra as variações entre os valores de R encontrados nos doadores.

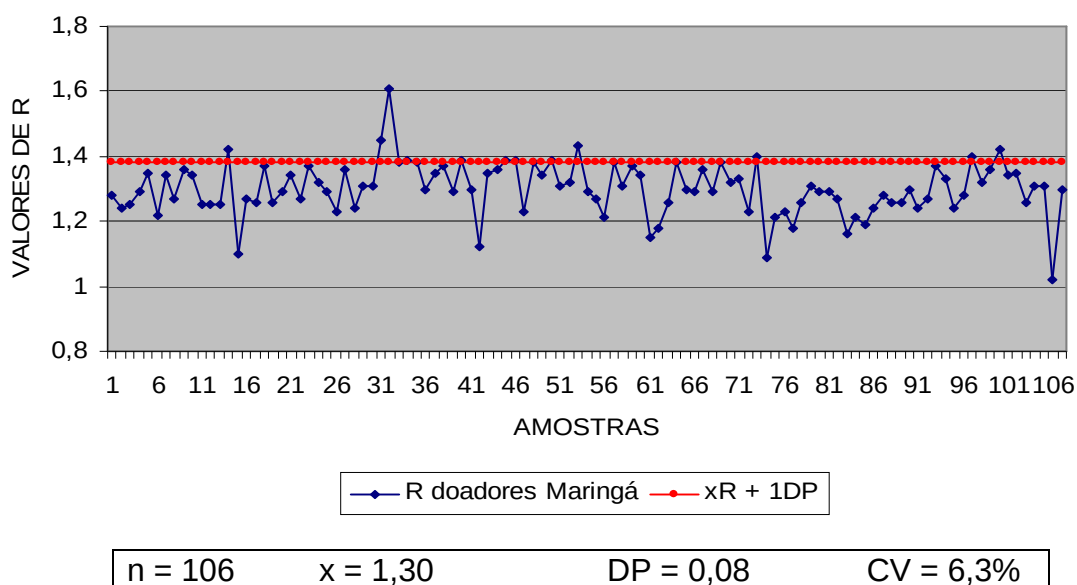
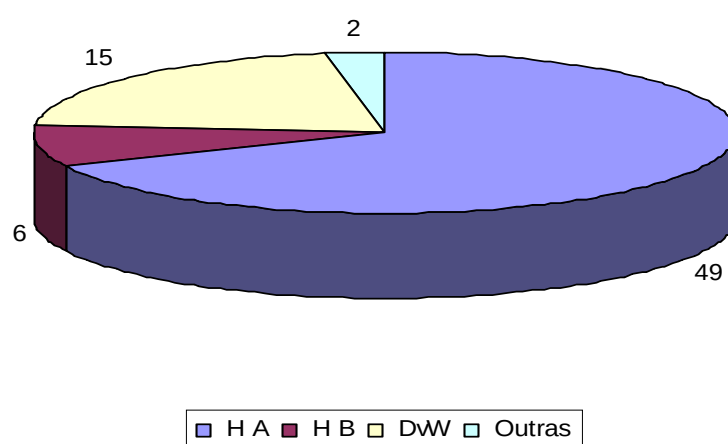


FIGURA 5 - Variação entre os valores de R encontrados nos doadores de sangue do Hemocentro Regional de Maringá.

Acompanhamento laboratorial dos pacientes hemofílicos

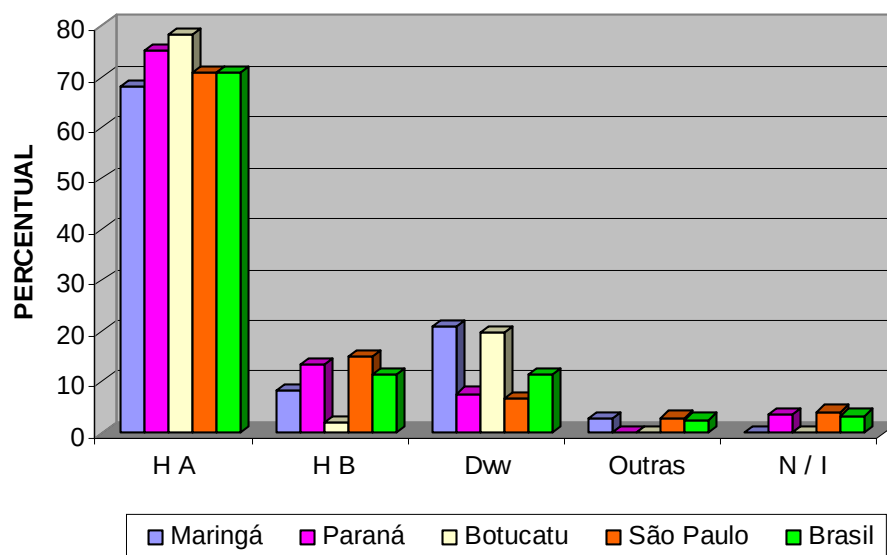
O Hemocentro Regional de Maringá possui 72 pacientes cadastrados com coagulopatias. A distribuição conforme o diagnóstico está representada na Figura 6.



HA - hemofilia A, HB - hemofilia B, DvW – Doença de Von Willebrand

FIGURA 6 – Distribuição das coagulopatias cadastradas Hemocentro Regional de Maringá

A Figura 7 mostra o comparativo entre os percentuais de coagulopatias cadastrados no Hemocentro Regional de Maringá em relação aos dados do estado do Paraná, Hemocentro de Botucatu, estado de São Paulo e Brasil.



HA - hemofilia A, HB - hemofilia B, DvW – Doença de Von Willebrand, N/I – não identificadas.

FIGURA 7 – Percentual de coagulopatias: comparação entre Maringá, Paraná, Botucatu, São Paulo e Brasil.

Dos 49 pacientes cadastrados como hemofílicos A, compareceram no serviço para coleta de material para a realização de exames laboratoriais 41 pacientes, no período compreendido entre março a dezembro de 2007. As amostras foram coletadas desde que o paciente estivesse sem uso concentrado de FVIII por pelo menos 72 horas.

Os 06 pacientes cadastrados com hemofilia B compareceram ao serviço para a coleta dos exames laboratoriais. Do mesmo modo, as amostras foram coletadas desde que os pacientes estivessem sem uso concentrado de FIX por pelo menos 72 horas.

A tabela 3 mostra a distribuição dos resultados das dosagens de FVIII e FIX, agrupados conforme a classificação das hemofilias em grave, moderada e leve ⁴⁰, e o resultado da pesquisa de inibidores realizada pelo Teste de Mistura.

TABELA 3 – Classificação das hemofilias cadastradas no Hemocentro Regional de Maringá e presença de inibidores

	HEMOFILIA A		HEMOFILIA B	
	Dosagem FVIII	Pesquisa inibidor	Dosagem FIX	Pesquisa inibidor
	pos		pos	
< 1% (grave)	17	06	0	0
1-5% (moderada)	15	0	01	0
>5%-<40% (leve)	09	0	05	0
TOTAL	41	06	06	0

Os pacientes que apresentaram Pesquisa de Inibidores positiva tiveram os títulos quantificados através do método Bethesda. São considerados inibidores de baixa resposta títulos persistentemente menores que 05 (cinco) UB/ml, apesar do constante estímulo com o fator deficiente. Inibidores de alta resposta são aqueles cuja atividade inibitória seja maior que 05 (cinco) UB/ml em qualquer momento da existência do inibidor ⁴⁰. Os resultados da dosagem de inibidores de FVIII encontrados estão mostrados na Figura 9.

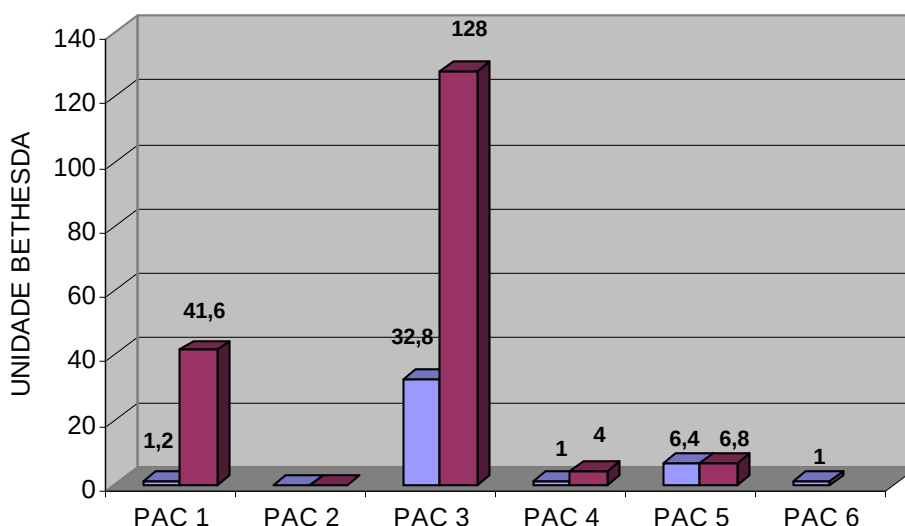


FIGURA 9 – Resultados das dosagens de inibidores de FVIII realizadas nos pacientes com pesquisa de inibidores positiva

Os pacientes 1, 2 e 5 já apresentavam pesquisa de inibidor positiva realizada no HEMEPAR - Curitiba. As dosagens de inibidores foram realizadas em duas amostras diferentes durante o período do estudo nos pacientes 1, 3, 4 e 5. No paciente 2, a amostra coletada para a pesquisa de inibidor e dosagem de FVIII não foi suficiente para a conclusão da dosagem e o paciente não retornou ao serviço para coleta de nova amostra no restante do período do estudo. A detecção do inibidor e a respectiva dosagem no paciente 6 ocorreu no final do período de estudo, não havendo oportunidade para a realização de nova coleta de amostra. O paciente 1 apresentou uma titulação de baixa resposta (1,2 UB/ml) e uma de alta resposta (41,6 UB/ml). O paciente 3 apresentou títulos de alta resposta em ambas as dosagens (32,8 e 128 UB/ml), sendo realizada também uma dosagem de inibidor no HEMEPAR - Curitiba, onde foi detectado um título de 380 UB/ml. O paciente 4 apresentou inibidores de baixa resposta nas dosagens realizadas em Maringá (1,0 e 4,0 UB/ml) e também em uma dosagem realizada no HEMEPAR, de 1,3 UB/ml. O paciente 4 apresentou inibidor de alta resposta nas duas dosagens realizadas em Maringá (6,4 e 6,8 UB/ml). O inibidor detectado no paciente 6 apresentou comportamento de baixa resposta (1 UB/ml).

Na Tabela 4, comparamos o percentual de inibidores encontrado no Hemocentro Regional de Maringá em relação ao número de pacientes classificados como hemofílicos graves, com o encontrado no Paraná e Brasil.

TABELA 4 – Frequência de inibidores: comparação entre os índices encontrados no Hemocentro Regional de Maringá com os índices do Paraná, Botucatu, São Paulo e Brasil.

	Maringá	Paraná	Botucatu	São Paulo	Brasil
Frequência inibidores	35,3%	13,4%	21,7%	10,3%	20%
Hemofilia Grave*	06 (17)	23 (171)	05 (23)	75 (726)	366 (1831)
Frequência inibidores Hemofilia Moderada**			12,5% 01 (08)		

* Número de pacientes com inibidores em relação ao total com hemofilia grave

** Número de pacientes com inibidores em relação ao total com hemofilia moderada

Dados apresentados na literatura relatam uma incidência de inibidores de FVIII em pacientes com hemofilia A grave tratados com terapia de reposição em torno de 20-30%, podendo ser encontrados índices de até 52% em alguns estudos ^{7,10,11,14,16,17,29,30,41}. Na hemofilia grave, com a completa ausência do FVIII, o fator exógeno administrado é reconhecido como estranho e isto estimula o desenvolvimento do inibidor. Nas hemofilias moderada e leve, geralmente os episódios de sangramento são relativamente discretos e a utilização dos concentrados de fator é menor que na hemofilia grave. Nos hemofílicos cadastrados no Hemocentro Regional de Maringá, os inibidores apareceram somente em pacientes com hemofilia A grave, correspondendo a 35,3% deste grupo e 12,8% do total de hemofílicos, A e B, pesquisados. Os dados encontrados em Maringá corroboram com o descrito na literatura, embora seja significativamente maior que o encontrado no Hemocentro de Botucatu e descrito nos estados do Paraná, São Paulo e Brasil ⁴². A ocorrência de inibidores nos pacientes cadastrados no Hemocentro de Botucatu foi de 21,7% dos portadores de hemofilia A grave e 12,5% das hemofilias A moderadas. Normalmente, o aparecimento de inibidores na hemofilia leve ou moderada está associada com o tipo de mutação do gene do FVIII, e sua prevalência é em média 3-13% ^{25,43}.

Ressaltamos ainda que dos 06 pacientes com pesquisa de inibidor positiva, 3 foram novos diagnósticos, e o acompanhamento laboratorial periódico desses pacientes é necessário a fim de se avaliar a persistência destes inibidores, bem como sua titulação, visto que em torno de 30% dos inibidores encontrados, principalmente na infância, são transitórios, e tendem a desaparecer em torno de 6 meses após o seu desenvolvimento ²⁵.

Durante o período do estudo, ainda foram realizados exames de pacientes encaminhados ao Ambulatório de Hematologia do Hemocentro Regional de Maringá para investigação de distúrbios de coagulação, bem como de familiares de pacientes hemofílicos.

CONCLUSÃO

A qualidade do resultado final de uma análise laboratorial depende de uma série de fatores, que incluem condições inerentes ao paciente, como a coleta de sangue, preparo da amostra, reagentes, equipamentos, recursos humanos, entre outros. No que se refere ao estudo laboratorial da hemostasia, alterações no resultado podem ocorrer por discretas falhas em um ou mais destes fatores.

Na comparação dos resultados obtidos pelo Hemocentro Regional de Maringá em relação ao laboratório de referência do Hemocentro de Botucatu, observamos que embora os testes estatísticos apresentassem diferenças significativas entre os resultados de TTPA, %TP e dosagem de fibrinogênio, quando comparados aos valores de referência, a interpretação do que seria um resultado dentro dos valores normais ou alterados, houve concordância de 100% entre os resultados de TTPA e %TP, e 98,1% dos resultados de dosagem de fibrinogênio. Não houve diferença significativa entre os valores de RNI, concordando com os dados da literatura que descrevem que o RNI deve possuir o mesmo valor para a mesma amostra em diferentes condições de trabalho. Desta forma, consideramos que as condições de trabalho implementadas no Hemocentro de Maringá para a realização de exames para o estudo da hemostasia encontram-se satisfatórias.

Durante o período de estudo, três novos casos de presença de inibidores foram detectados em pacientes que apresentavam sangramento persistente com resposta insatisfatória ao tratamento convencional pelo concentrado de FVIII. A detecção dos inibidores num menor período de tempo foi importante para a determinação na mudança do protocolo de tratamento e obtenção de melhora clínica destes pacientes.

A realização de exames de estudo da hemostasia no Hemocentro de Maringá auxiliou no atendimento a pacientes encaminhados ao Ambulatório de Hematologia, para investigação de história clínica de sangramentos e dosagens de FVIII e FIX em familiares de pacientes hemofílicos.

A dosagem de FVIII no Hemocentro Regional de Maringá também absorveu a demanda do setor de Controle de Qualidade de Hemocomponentes, na realização de dosagens nos plasmas frescos produzidos no serviço.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lorenzi TF. Manual de Hematologia – Propedêutica e Clínica. 2ª ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999.
2. Ozelo MC, Villaça PR, Almeida JOS, Bueno TMF, Miranda PAP, Hart WM et al. A cost evaluation of treatment alternatives for mild-to-moderate bleeding episodes in patients with haemophilia and inhibitors in Brazil. *Haemophilia*. 2007;13:462-469.
3. Shetty S, Ghosh K, Pathare A, Jijina F and Mohanty. Molecular characterization of haemophilia A and B in Indians. *Haemophilia*. 1998; 4: 802-805.
4. David D, Morais S, Ventura C and Campos M. Female haemophiliac homozygous for the factor VIII intron 22 inversion mutation, with transcriptional inactivation of one of factor VIII alleles. *Haemophilia*. 2003; 9: 125-130.
5. Jayandharan G, Shaji RV, Baidya S, Nair SC, Chandy M and Srivastava A. Identification of factor VIII gene mutations in 101 patients with haemophilia A: mutation analysis by inversion screening and multiplex PCR and CSGE and molecular modeling of 10 novel missense substitutions. *Haemophilia*. 2005; 11: 481-491.
6. Villaça PR, Carneiro JDA, D'amico EA. Hemofilias. In: Zago MA, FALCÃO RP, Pasquini R. Hematologia – Fundamentos e Prática. São Paulo: Editora Atheneu, 2001. p.803-818.
7. Peerlink K and Hermans C. Epidemiology of inhibitor formation with recombinant factor VIII replacement therapy. *Haemophilia*. 2006; 12: 579-590.
8. Sahud MA, Pratt KP, Zhukov K, Qu K and Thompson AR. ELISA system for detection of immune responses to FVIII: a study of 246 samples and correlation with the Bethesda assay. *Haemophilia*. 2007; 13: 317-322.
9. Chambers EA, Brown SA, Keeling D, Liesner R, Richards M, Stirling D et al. Early factor VIII exposure and subsequent inhibitor development in children with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2007; 13: 149-155.
10. Lollar, P. Pathogenic antibodies to coagulation factors. Part one: Factor VIII and Factor IX. *J Thromb Haemost*. 2004; 2: 1082-1095.
11. Dimichele DM. Inhibitor treatment in haemophilias A and B: inhibitors diagnosis. *Haemophilia* 2006; 12 (suppl. 6): 37-42. *Haemophilia*. 2007; 13: 104-105.

12. Kadar JG, Schuster J, Hunzelmann N. Ig-E-mediated anaphylactic reaction to purified and recombinant factor VIII in a patient with severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2007; 13: 104-105.
13. White GC, Kempton CL, Grimsle A, Nielsen B, Roberts HR. Cellular immune responses in hemophilia: why do inhibitors develop in some, but not all hemophiliacs? *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1676-1681.
14. Berntorp E. et al. Haemophilia Inhibitor Genetics Study – evaluation of a model for studies of complex diseases using linkage and association methods. *Haemophilia*. 2005; 11: 427-429.
15. Saint-Remy JMR, Lacroix-Desmazes S, Oldenburg J. Inhibitors in haemophilia: pathophysiology. *Haemophilia*. 2004; 10 (sup. 4): 146-151.
16. Dimichele D. Inhibitors: resolving diagnostic and therapeutic dilemmas. *Haemophilia*. 2002; 8: 280-287.
17. Astermark J. et al. The Malmö International Brother Study (MIBS): further support for genetic predisposition to inhibitor development. *Haemophilia*. 2001; 7: 267-272.
18. Lee CA, Aledort LM. Coagulation deficiencies: a look to the future¹. *Haemophilia*. 2007; 13: 750-757.
19. Pollmann H, Externest D, Ganzer A, Eifrig B, Kreuz W, Lenk H et al. Efficacy, safety and tolerability of recombinant factor VIII (REFACTO[®]) in patients with haemophilia A: interim data from a postmarketing surveillance study in Germany and Austria. *Haemophilia*. 2007; 13: 131-143.
20. Scharrer I, Bray GL, Neutzling O. Incidence of inhibitors in haemophilia A patients – a review of recent studies of recombinant and plasma-derived factor VIII concentrates. *Haemophilia*. 1999; 5: 145-154.
21. Hay CRM. The epidemiology of factor VIII inhibitors. *Haemophilia*. 2006; 12 (sup^o6): 23-29.
22. Lillicrap D, Nair SC, Srivastava A, Rodeghiero F, Pabinger I, Federici AB. Laboratory issues in bleeding disorders. *Haemophilia*. 2006; 12 (supl 3): 68-75.
23. Goudemand J, Rothschild C, Demiguel V, Vinciguerrat C, Thierry L, Chambost H et al. Influence of the type of factor VIII concentrate on the incidence of factor VIII inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A. *Blood*. 2006; 107(1): 46-51.

24. Gouw SC, van der Bom JG, Auerswald G, Ettinghausen CE, Tedgard U, van der Berg HM. Recombinant versus plasma-derived factor VIII products and the development of inhibitors in previously untreated patients with severe hemophilia A: the CANAL cohort study. *Blood*. 2007; 109 (11): 4693-4697.
25. Gringeri A, Mannuci PM. Italian guidelines for the diagnosis and treatment of patients with haemophilia and inhibitors. *Haemophilia*. 2005; 11: 611-19.
26. Cid AR, Casaña P, Cabrera N, Haya S, Cortina V, Aznar JA. Inhibitor development in one patient and laboratory discrepancies in several families with both mild haemophilia and Arg531Cys mutation. *Haemophilia*. 2007; 13: 206-208.
27. Cross DCA, Van Den Berg HM. Cyclosporin A can achieve immune tolerance in a patient with haemophilia B and refractory inhibitors. *Haemophilia*. 2007; 13: 111-114.
28. Curry NS, Misbah SA, Giangrande PLF, Keeling DM. Achievement of immune tolerance in a patient with haemophilia B and Inhibitory antibodies, complicated by an anaphylactoid reaction. *Haemophilia*. 2007; 13: 328-330.
29. Knight C. Health economics of treating haemophilia A with inhibitors. *Haemophilia*. 2005; 11(sup. 1): 11-17.
30. Wight J, Paisley S, Knight C. Immune tolerance induction in patients with haemophilia A with inhibitors: a systematic review. *Haemophilia*. 2003; 9: 436-63.
31. Tamura K, Kanazawa T, Suzuki M, Shioya A, Morikawa A. Successful induction of immune tolerance by continuous infusion of recombinant factor VIII in a haemophilia A patient with high-inhibitor titres. *Haemophilia*. 2006; 12: 100-02.
32. Moschovi M, Aronis S, Trimis G, Platokouki H, Salavoura K, Tzortzatou-Stathopoulou F. Rituximab in the treatment of high responding inhibitors in severe haemophilia A. *Haemophilia*. 2006; 12: 95-9.
33. Rizzatti EG, Franco RF. Investigação diagnóstica dos distúrbios hemorrágicos. *Medicina Ribeirão Preto*. 2001; 34: 238-247.
34. Verbruggen B, Novakova I, Wessels H, Boezeman J, van den Berg M, Mauser-Bunschoten E. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. *J Thromb Haemost*. 1995; 73: 247-251.

35. Chuansumrit A, McCraw A, Preston F. Essential issues of laboratory investigation for patients with haemophilia and bleeding disorders. *Haemophilia*. 2004; 10(sup 4): 105-108.
36. Pagano M, Gauvreau K. Princípios de Bioestatística. Tradução da 2ª ed norte-americana: Editora Thomson; 2004.
37. Hirsh J, Poller LA. The international normalized ratio: a guide to understanding and correcting its problems. *Intern Med*. 1994; 154: 282-288.
38. Terra P. Coagulação – Interpretação clínica dos testes laboratoriais de rotina. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.
39. Dacie JV, Lewis SM. *Practical Haematology*. 8 ed. New York: Churchill Livingstone, 1996.
40. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Manual de tratamento das coagulopatias hereditárias, Brasília, 2005. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/sangue/p_hemofilia/programa.pdf (acesso dezembro 2007).
41. Hill FGH. The incidence of factor VIII and factor IX inhibitors in the hemophilia population of UK and their effect on subsequent mortality, 1977-99. *J Thromb Haemost*. 2004; 2:1047-1054.
42. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. Relatório Estatístico do Cadastro de Coagulopatias Hereditárias, Brasília, 2002. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/sangue/p_hemofilia/programa.pdf (acesso dezembro 2007).
43. Peerlinck K, Jacquemin M. Characteristics of inhibitors in mild/moderate haemophilia A. *Haemophilia*. 2006; 12 (sup 6): 43-47.

ANEXOS

ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO
NO ESTUDO:**

“Estudo Laboratorial de Pacientes Hemofílicos Cadastrados no Hemocentro Regional de Maringá - PR”.

Justificativas, objetivos e procedimentos: O objetivo principal deste projeto é implantar exames laboratoriais para o estudo da coagulação do sangue. Uma vez que estes exames estejam sendo oferecidos pelo Hemocentro Regional de Maringá, o estudo dos fatores de coagulação para confirmar o tipo de hemofilia e a presença ou não de inibidor de fator, será realizado nos pacientes hemofílicos cadastrados no Ambulatório de Hematologia deste Hemocentro.

Desconforto e riscos: O desconforto se relaciona somente à picada da agulha, que pode gerar um leve ardor no local da coleta. A coleta será feita pela técnica à vácuo, com material descartável, sem risco de contaminação para o participante.

Benefícios esperados: A determinação do tipo de hemofilia e a existência ou não de inibidor orienta corretamente o tratamento de reposição a ser escolhido pelo médico, melhorando a qualidade de vida dos hemofílicos.

Métodos alternativos existentes: os vários grupos de doenças que afetam a coagulação normal do sangue causando sangramentos exagerados, tem sinais e sintomas semelhantes, ficando bastante limitado o seu diagnóstico somente pelo exame clínico. Os exames laboratoriais são indispensáveis para o diagnóstico e acompanhamento do tratamento de reposição.

Assistência: Não existem riscos para o participante deste estudo, pois a coleta de sangue é simples e será realizada por um técnico de enfermagem e/ou bioquímico, mas o participante receberá assistência no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro, sob a responsabilidade do médico hematologista e/ou no Hospital Universitário Regional de Maringá, se for necessário.

Esclarecimentos: Qualquer esclarecimento sobre o trabalho poderá ser fornecido pela pesquisadora deste projeto (dados abaixo).

Privacidade: O pesquisador do projeto garante que os dados do participante serão mantidos em segredo e o seu nome não será exposto nas conclusões ou publicações do estudo.

Formas de ressarcimento e indenização: O participante não terá despesas na realização destes exames e a sua participação será voluntária, ou seja, não haverá pagamento para o participante ou seu familiar.

Liberdade de recusar ou retirar o consentimento: O participante ou seu responsável tem a liberdade de recusar ou retirar o consentimento a qualquer momento sem prejuízo ao seu cuidado.

Destino das amostras: As amostras restantes serão descartadas conforme os procedimentos determinados pelo Plano de Gestão de Resíduos do Hospital Universitário Regional de Maringá.

Eu, _____,
(*responsável pelo menor, se for o caso*) após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este projeto com o Dr.

_____, CONCORDO
VOLUNTARIAMENTE, em participar do estudo (*ou que o meu filho, se for o caso*) _____ participe do mesmo.

Assinatura (do participante ou seu responsável)

Data: ____/____/____

Eu, Sandra de Souza Schiller, responsável pelo projeto de pesquisa, declaro que prestei todas as informações aos responsáveis e comprometo-me a conduzir todas as atividades deste projeto de acordo com as normas da Resolução 196/96 CNS e complementares.

Assinatura do pesquisador

Data: ____/____/____

Sandra de Souza Schiller – Farmacêutica-Bioquímica
Rua Vereador Arlindo Planas, 774 – Maringá, PR
CEP: 87080-330
Fone: 44-3265-7599 / 44-8801-5263
E-mail: sandra-schiller@hotmail.com

Dra. Izolete Aparecida Thomazini Santos
Rua Floriano Simões, 497 – Botucatu, SP
Fone: 14-3882-2520
E-mail: izolete@fmb.unesp.br

Comitê Permanente de Ética e Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Bloco 10 sala 01
Avenida Colombo, 5790 – Maringá, PR
CEP 87020-900
Fone-Fax: 44-3261-4444
E-mail: copep@uem.br

ANEXO B – POP Tempo de Protrombina (TP)

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO TEMPO DE PROTROMBINA (TP)	LAB-HEMOS POP 001/00 Página: 1/3
---	--	---

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Revisado	Data	Rubrica
Elaboração	SandraSchiller	Jun/2007				
Verificação						
Aprovação						
Ciência da Garantia da Qualidade						
				Periodicidade: Revisão Anual		

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Item Alterado/Justificativa
Alteração				
Aprovação				

1.Princípio:

A medição do TP constitui um teste de triagem rápido e sensível para detectar transtornos da coagulação no âmbito do sistema extrínseco (fatores II, V, VII e X). O teste mede o tempo de coagulação na presença de uma concentração ideal de extrato tecidual (tromboplastina) e indica a eficiência da via extrínseca da coagulação.

2. Escopo:**2.1 Laboratório de Hemostasia****3. Responsabilidade:****3.1 Bioquímico e técnico de laboratório****4. Amostra:**

4.1 Coletar amostra de sangue total em anticoagulante Citrato de Sódio 3,2%, sendo 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante.

4.2 Centrifugar a 3000 rpm e a 10°C durante 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Separar o plasma sobrenadante usando uma pipeta Pasteur plástica retirando os dois terços superiores do sobrenadante.

4.3 A amostra é estável por 4 horas entre 15-25°C.

4.4 Caso o exame não seja realizado dentro deste período, congelar a amostra a – 80°C.

5. Reagentes e Materiais Necessários:

- 5.1 Reagente Tromborel® S: tromboplastina liofilizada proveniente de placenta humana
- 5.2 Plasma humano padrão - Dade
- 5.3 Micropipeta automática de 50 µl
- 5.4 Micropipeta automática de 100 µl
- 5.5 Ponteiras descartáveis
- 5.6 Tubos de ensaio plásticos descartáveis
- 5.7 Cubetas para coagulômetro

6. Equipamentos:

- 6.1 Centrífuga refrigerada de bancada Spin VI - Incibrás
- 6.2 Coagulômetro Fibrintimer II – Dade Behring (FBT II)

7. Controles:

- 7.1 Plasma controle normal – Dade Behring

8. Procedimento:

8A-Determinação da curva de referência – preparar as diluições conforme o esquema a seguir:

% Plasma Padrão	Diluição	Plasma Padrão(µl)	Solução Fisiológica (µl)
100%	1: 1	50	-
50%	1: 2	100	100
25%	1: 4	100 dil 1:2	100
12,5%	1: 8	100 dil. 1:4	100

8A.1 Determinar o TP de cada diluição conforme a técnica no item 8B.

8A.2 Converter os valores percentuais do Plasma Padrão de acordo com o valor de cada lote.

8A.2 Inserir os valores do Plasma Padrão e os respectivos tempos de coagulação na função Calibração, conforme descrito no manual do fabricante do equipamento FBT II.

8A.3 Uma nova curva de referência deve ser realizada sempre que se mudar o lote do reagente Tromborel® S.

8B – Determinação do TP

8B.1 Reconstituir a tromboplastina em água deionizada na quantidade indicada no rótulo. Levar a 37°C por pelo menos 30 minutos antes do uso.

8B.2 Pré-aquecer as cubetas a 37°C no termobloco do FBT II.

8B.3 Pipetar em uma cubeta pré-aquecida, 50 µl de plasma do paciente.

8B.4 Incubar por 1 min a 37 °C.

8B.5 Transferir a cubeta para o canal de leitura.

8B.6 Adicionar 100 µl do reagente Tromborel® S, pré-aquecido a 37 °C.

8B.7 Aguardar o término da leitura.

8B.8 Imprimir o resultado acionando a tecla START (o tempo em segundos será convertido em % e RNI).

8B.8 Realizar o mesmo procedimento para o Plasma Controle Normal.

9. Interpretação dos resultados:

9.1 Valor de referência: acima de 70%.

9.2 As principais causas de prolongamento do TP são: uso de anticoagulantes orais antagonistas da vitamina K; doença hepática; deficiência de vitamina K; coagulação intravascular disseminada; deficiência de fator VII, X, V ou protrombina.

10. Documentação: Não se aplica.

11. Recomendações ou Precauções:

11.1 Observar os cuidados com biossegurança, conforme o Manual de Biossegurança do Hemocentro Regional de Maringá.

11.2 Trabalhar em ambiente climatizado entre 20 – 24°C.

12. Referências:

12.1 Dacie, J.V. & Lewis, S.M. "Practical Haematology". Churchill Livingstone, 2 ed, 1995.

12.2 Terra, P. "Coagulação – Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina". Atheneu, 3 ed, 2004.

12.3. Bula do reagente Tromborel® S - Dade Behring

ANEXO C – POP Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA (TTPA)	LAB-HEMOS POP 002/00 Página: 1/3
---	---	--

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Revisado	Data	Rubrica
Elaboração	SandraSchiller	Jun/2007				
Verificação						
Aprovação						
Ciência da Garantia da Qualidade						
				Periodicidade: Revisão Anual		

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Item Alterado/Justificativa
Alteração				
Aprovação				

1. Princípio:

Este teste mede o tempo de coagulação do plasma pobre em plaquetas (PPP) após a ativação dos fatores de contato, através da adição de um reagente fosfolipídico que não contém fator tecidual, sendo por isso chamado de tromboplastina parcial. Este reagente deve ser capaz de atuar como superfície de fosfolipídico, substituindo aquele representado fisiologicamente pela membrana plaquetária.

O TTPA é sensível aos fatores da via intrínseca e da via comum: XII, PK, CAPM, XI, IX, VIII-C, X, V, II e fibrinogênio. Também é sensível à presença de anticoagulantes circulantes (inibidores) e à heparina, sendo o teste de escolha para a sua monitorização.

2. Escopo:**2.1 Laboratório de Hemostasia****3. Responsabilidade:****3.1 Bioquímico e técnico de laboratório.**

4. Amostra:

- 4.1 Coletar amostra de sangue total em anticoagulante Citrato de Sódio 3,2%, sendo 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante.
- 4.2 Centrifugar a 3000 rpm e a 10°C durante 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Separar o plasma sobrenadante usando uma pipeta Pasteur plástica retirando os dois terços superiores do sobrenadante.
- 4.3 Realizar a análise até 2 horas após a coleta.
- 4.4 Caso o exame não seja realizado dentro deste período, congelar a amostra a – 80°C.
- 4.5 Não conservar em gelo. Não deixar mais que 5 minutos a 37°C.

5. Reagentes e Materiais Necessários:

- 5.1 Actin® Reagente de Cefaloplastina Ativada
- 5.2 Cloreto de Cálcio
- 5.3 Micropipeta automática de 50 µl
- 5.4 Ponteiros descartáveis
- 5.4 Cubetas para coagulômetro

6. Equipamentos:

- 6.1 Centrífuga refrigerada de bancada Spin VI - Incibrás
- 6.2 Coagulômetro Fibrintimer II – Dade Behring (FBII)

7. Controles:

- 7.1 Pool de plasma normal
- 7.2 Plasma controle normal – Dade Behring

8. Procedimento:

- 8.1 Aquecer, previamente o CaCl_2 a 37°C, no termobloco do equipamento FBT II.
- 8.2 Aquecer, previamente, a 37°C o Reagente Actin®, por cubeta, no termobloco do equipamento FBII.
- 8.3 Pipetar em cada cubeta da seguinte maneira: 0,05 ml de Reagente Actin® pré-aquecido + 0,05 ml de plasma (amostra).
- 8.4 Misturar e incubar a 37°C durante 120 s.
- 8.5 Transferir a cubeta para o canal de leitura e aguardar aparecer no visor do equipamento o comando pipetar.
- 8.5 Pipetar 0,05 ml de CaCl_2 .
- 8.6 Aguardar o término da leitura.
- 8.7 Imprimir o resultado acionando a tecla START.
- 8.8 Realizar o mesmo procedimento para o Pool de Plasma Fresco e o Plasma Controle Normal.

9. Interpretação dos resultados:

9.1 Calcular a razão entre o valor em segundos do plasma do paciente e o pool de plasma fresco. É considerada normal a relação paciente/pool até 1,25.

9.2 Para validar a reação é necessário que o valor do Plasma Controle Normal esteja dentro do intervalo em segundos estabelecido na bula do reagente.

9.3 As causas mais comuns de TTPA prolongado são: deficiência de fator(es) da via intrínseca e/ou da via comum; coagulação intravascular disseminada; doença hepática; uso de heparina ou contaminação da amostra com heparina; anticoagulante circulante; transfusão sanguínea maciça.

10. Documentação: Não se aplica.

11. Recomendações ou Precauções:

11.1 Observar os cuidados com biossegurança, conforme o Manual de Biossegurança do Hemocentro Regional de Maringá.

11.2 Trabalhar em ambiente climatizado entre 20 – 24°C.

12. Referências:

12.1 Dacie, J.V, & Lewis, S.M. "Practical Haematology". Churchill Livingstone, 2 ed, 1995.

12.2 Terra, P. "Coagulação – Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina". Atheneu, 3 ed, 2004.

12.3 Bula do reagente Actin® - Dade Behring.

ANEXO D – POP Pesquisa de inibidor – teste de mistura

 HEMEPAR MARINGÁ	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PESQUISA DE INIBIDOR – TESTE DE MISTURA	LAB-HEMOS POP 003/00 Página: 1/3
---	--	---

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Revisado	Data	Rubrica
Elaboração	SandraSchiller	Jun/2007				
Verificação						
Aprovação						
Ciência da Garantia da Qualidade						
Periodicidade: Revisão Anual						

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Item Alterado/Justificativa
Alteração				
Aprovação				

1. Princípio:

1.1 Anticoagulantes circulantes ou inibidores adquiridos de fatores da coagulação afetam o TTPA e podem atuar imediatamente ou serem tempo-dependentes. Quando um plasma normal é misturado a um plasma contendo um inibidor que age imediatamente, não haverá alteração no TTPA ou haverá uma pequena diminuição no tempo de coagulação. Entretanto, na presença de um inibidor tempo-dependente, a mistura de plasma com inibidor com plasma normal na proporção 1:1 causará uma redução significativa no tempo de coagulação do TTPA de imediato. Entretanto, após uma a duas horas de incubação a 37°C, esta correção será abolida e o TTPA voltará a se alargar.

2. Escopo:

2.1 Laboratório de Hemostasia

3. Responsabilidade:

3.1 Bioquímico e técnico de laboratório.

4. Amostra:

4.1 Coletar amostra de sangue total em anticoagulante Citrato de Sódio 3,2%, sendo 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante.

4.2 Centrifugar a 3000 rpm e a 10°C durante 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Separar o plasma sobrenadante usando uma pipeta Pasteur plástica retirando os dois terços superiores do sobrenadante.

4.3 Realizar a análise até 2 horas após a coleta.

4.4 Caso o exame não seja realizado dentro deste período, congelar a amostra a – 80°C.

4.5 Não conservar em gelo. Não deixar mais que 5 minutos a 37°C.

5. Reagentes e Materiais Necessários:

5.1 Actin® Reagente de Cefaloplastina Ativada

5.2 Cloreto de Cálcio

5.3 Pool de plasma normal

5.4 Micropipeta automática de 50 µl

5.5 Ponteiras descartáveis

5.6 Cubetas para coagulômetro

6. Equipamentos:

6.1 Centrífuga refrigerada de bancada Spin VI - Incibrás

6.2 Coagulômetro Fibrintimer II – Dade Behring (FBII)

6.3 Banho-maria a 37°C

7. Controles: Não se aplica.

8. Procedimento:

8.1 Preparar uma mistura de partes iguais do plasma do paciente e do pool de plasma normal no seguinte volume: 200 µl do plasma do paciente + 200 µl do plasma normal.

8.2 Realizar o TTPA da mistura, conforme POP 002/00.

8.3 Incubar a mistura em Banho-Maria a 37°C por 2 (duas) horas.

8.4 Realizar o TTPA da mistura ao término do período de incubação.

8.5 Calcular a razão entre o TTPA pós-incubação e o TTPA pré-incubação.

8.6 Anotar o resultado da razão.

9. Interpretação dos resultados:

9.1 Valores da razão $\geq 1,38$ indicam presença de inibidor; valores $< 1,38$ indicam ausência de inibidor.

9.2 Quando a pesquisa for positiva, realizar a dosagem de inibidor conforme o POP 005/00.

10. Documentação: Não se aplica.

11. Recomendações ou Precauções:

11.1 Observar os cuidados com biossegurança, conforme o Manual de Biossegurança do Hemocentro Regional de Maringá.

11.2 Trabalhar em ambiente climatizado entre 20 – 24°C.

12. Referências:

- 12.1 Dacie, J.V, & Lewis, S.M. "Practical Haematology". Churchill Livingstone, 2 ed, 1995.
- 12.2 Terra, P. "Coagulação – Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina". Atheneu, 3 ed, 2004.

ANEXO E – POP Dosagem de fator VIII e IX

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DOSAGEM DE FATOR VIII E IX	LAB-HEMOS POP 004/00 Página: 1/3
---	---	---

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Revisado	Data	Rubrica
Elaboração	SandraSchiller	Jun/2007				
Verificação						
Aprovação						
Ciência da Garantia da Qualidade						
				Periodicidade: Revisão Anual		

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Item Alterado/Justificativa
Alteração				
Aprovação				

1. Princípio:

A deficiência de um dos fatores da via intrínseca da coagulação provoca um prolongamento do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA). Para a determinação de um dos fatores individuais, é medido o TTPA de uma mistura do respectivo plasma deficiente no fator que se deseja investigar com o plasma do paciente. Um plasma de paciente, ao qual falte o respectivo fator de coagulação, não está em posição de poder compensar a ausência desse fator no plasma deficiente, resultando num prolongamento do TTPA. A atividade do fator de coagulação expressa em % do valor normal é determinada através de uma curva de referência, determinada com a mistura de diluições de plasma humano padrão ou de um pool de plasma normal com esse plasma deficiente.

2. Escopo:**2.1 Laboratório de Hemostasia****3. Responsabilidade:****3.1 Bioquímico e técnico de laboratório.**

4. Amostra:

- 4.1 Coletar amostra de sangue total em anticoagulante Citrato de Sódio 3,2%, sendo 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante.
- 4.2 Centrifugar a 3000 rpm e a 10°C durante 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Separar o plasma sobrenadante usando uma pipeta Pasteur plástica retirando os dois terços superiores do sobrenadante.
- 4.3 Realizar a análise até 2 horas após a coleta.
- 4.4 Caso o exame não seja realizado dentro deste período, congelar a amostra a – 80°C.

5. Reagentes e Materiais Necessários:

- 5.1 Actin® Reagente de Cefaloplastina Ativada
- 5.2 Solução de Cloreto de Cálcio 0,025 mol/l
- 5.3 Plasma deficiente em fator de coagulação VIII - Dade
- 5.4 Plasma deficiente em fator de coagulação IX - Dade
- 5.5 Tampão Veronal de Owren®
- 5.6 Plasma humano padrão - Dade
- 5.7 Micropipeta automática de 50 µl
- 5.8 Micropipeta volume ajustável de 100-1000 µl
- 5.9 Ponteiras descartáveis
- 5.10 Tubos de ensaio plásticos descartáveis
- 5.11 Cubetas para coagulômetro

6. Equipamentos:

- 6.1 Centrífuga refrigerada de bancada Spin VI - Incibrás
- 6.2 Coagulômetro Fibrintimer II – Dade Behring (FBTII)

7. Controles:

- 7.1 Plasma controle normal – Dade Behring

8. Procedimento:

8A-Determinação da curva de referência – preparar as diluições conforme o esquema a seguir:

% Plasma Padrão	Diluição	Plasma Padrão(µl)	Tampão Veronal de Owren® (µl)
100%	1: 5	40	160
75%	1: 6,7	30	170
50%	1: 10	20	180
25%	1: 20	10	190
5%	1: 100	40 dil. 1:20	160
1%	1: 500	40 dil. 1:100	160

- 8A.1 Dosar o fator de cada diluição conforme a técnica no item 8B.
- 8A.2 Converter os valores percentuais do Plasma Padrão de acordo com o valor de cada lote.
- 8A.3 Inserir os valores do Plasma Padrão e os respectivos tempos de coagulação na função Calibração, conforme descrito no manual do fabricante do equipamento FBTII.

8A.4 Uma nova curva de referência deve ser realizada sempre que se mudar o lote dos reagentes Actin® e Plasma deficiente.

8B – Dosagem do Fator

8B.1 Reconstituir o plasma deficiente no fator que se deseja dosar (VIII ou IX) em água deionizada, com o volume indicado no rótulo. Deixar em repouso por no mínimo 15 minutos, em temperatura ambiente, e misturar depois cuidadosamente. Antes de usar, misturar mais uma vez.

8B.2 Após a reconstituição o plasma deficiente pode ser congelado e descongelado uma vez. O descongelamento deverá ser efetuado a 37°C por no máximo 10 minutos.

8B.3 Diluir a amostra 1: 5 em tampão Veronal de Owren® nos seguintes volumes: 40 µl da amostra + 160 µl de tampão.

8B.3 Aquecer, previamente, o CaCl₂ a 37°C, no termobloco do equipamento FBTII.

8B.4 Aquecer as cubetas previamente, a 37°C, no termobloco do equipamento FBTII.

8B.5 Pipetar em cada cubeta: 50 µl de Reagente Actin® + 50 µl de plasma (amostra) + 50 µl de plasma deficiente.

8B.6 Misturar e incubar a 37°C durante 120 s.

8B.7 Transferir a cubeta para o canal de leitura e aguardar aparecer no visor do equipamento o comando pipetar.

8B.8 Pipetar 50 µl de CaCl₂.

8B.9 Acionar o botão START do equipamento FBTII manualmente.

8B.10 Aguardar o término da leitura.

8B.11 Imprimir o resultado acionando a tecla START.

8B.12 Realizar o mesmo procedimento para o Plasma Controle Normal.

9. Interpretação dos resultados:

9.1 Intervalo de referência para atividade do Fator VIII: 70-150% do valor normal.

9.2 Intervalo de referência para atividade do Fator IX: 70-120% do valor normal.

9.3 Os resultados destes testes devem ser interpretados em conjunto com o histórico clínico do paciente.

10. Documentação: Não se aplica.

11. Recomendações ou Precauções:

11.1 Observar os cuidados com biossegurança, conforme o Manual de Biossegurança do Hemocentro Regional de Maringá.

11.2 Trabalhar em ambiente climatizado entre 20 – 24°C.

12. Referências:

12.1 Dacie, J.V, & Lewis, S.M. “Practical Haematology”. Churchill Livingstone, 2 ed, 1995.

12.2 Terra, P. “Coagulação – Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina”. Atheneu, 3 ed, 2004.

12.3 Bula do reagente Plasma deficiente em fatores de coagulação - Dade Behring.

ANEXO F – POP Dosagem de inibidor – método Bethesda

 HEMEPAR MARINGÁ	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DOSAGEM DE INIBIDOR - MÉTODO BETHESDA	LAB-HEMOS POP 005/00 Página: 1/3
---	--	---

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Revisado	Data	Rubrica
Elaboração	SandraSchiller	Jun/2007				
Verificação						
Aprovação						
Ciência da Garantia da Qualidade						
				Periodicidade: Revisão Anual		

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Item Alterado/Justificativa
Alteração				
Aprovação				

1. Princípio:

O método baseia-se na dosagem de atividade do Fator VIII de uma mistura de partes iguais do plasma a ser testado, puro ou diluído, e de plasma normal contendo Fator VIII, após um período de incubação. O resultado é comparado ao obtido com um controle normal, testado da mesma maneira. A razão entre a atividade do Fator VIII das duas misturas é usada para calcular a quantidade de inibidor, expressa em unidades Bethesda.

2. Escopo:**2.1 Laboratório de Hemostasia****3. Responsabilidade:****3.1 Bioquímico e técnico de laboratório.****4. Amostra:**

4.1 Coletar amostra de sangue total em anticoagulante Citrato de Sódio 3,2%, sendo 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante.

4.2 Centrifugar a 3000 rpm e a 10°C durante 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Separar o plasma sobrenadante usando uma pipeta Pasteur plástica retirando os dois terços superiores do sobrenadante.

- 4.3 Realizar a análise até 2 horas após a coleta.
- 4.4 Caso o exame não seja realizado dentro deste período, congelar a amostra a – 80°C.
- 4.5 Não conservar em gelo. Não deixar mais que 5 minutos a 37°C.

5. Reagentes e Materiais Necessários:

- 5.1 Actin® Reagente de Cefaloplastina Ativada
- 5.2 Cloreto de Cálcio
- 5.3 Plasma deficiente em Fator VIII
- 5.4 Tampão Veronal®
- 5.3 Micropipeta automática de 50 µl
- 5.4 Micropipeta de volume ajustável de 100-1000 µl
- 5.5 Ponteiras descartáveis
- 5.6 Cubetas para coagulômetro
- 5.7 Pool de plasmas normais

6. Equipamentos:

- 6.1 Centrífuga refrigerada de bancada Spin VI - Incibrás
- 6.2 Coagulômetro Fibrintimer II – Dade Behring (FBII)
- 6.3 Banho-maria a 37°C

7. Controles:

- 7.1 Pool de plasma normal

8. Procedimento:

- 8.1 Preparar uma mistura de partes iguais do plasma do paciente e do pool de plasma normal no seguinte volume: 200 µl do plasma do paciente + 200 µl do plasma normal.
- 8.2 Preparar o controle, fazendo uma mistura de partes iguais de pool de plasma normal e tampão Veronal® no seguinte volume: 200 µl do plasma normal + 200 µl de tampão Veronal®.
- 8.3 Incubar as duas misturas em Banho-Maria a 37°C por 2 horas.
- 8.4 Realizar a dosagem do Fator VIII das duas misturas conforme descrito no POP 004/00.
- 8.5 Calcular o Fator VIII residual usando a seguinte razão:
$$\text{FVIII residual} = \frac{\% \text{ FVIII mistura}}{\% \text{ FVIII controle}} \times 100$$
- 8.6 Se a atividade de FVIII residual estiver entre 25-75%, usar a tabela de conversão para encontrar o valor correspondente em unidades de inibidor / ml (unidades Bethesda).
- 8.6 Se a atividade de FVIII residual for menor que 25%, fazer diluições do plasma do paciente em tampão Veronal® 1:2, 1:4, 1:8, etc e iniciar novamente o procedimento conforme itens 8.1.
- 8.5. Calcular o FVIII residual utilizando os valores encontrados nas dosagens das diferentes diluições e escolher o valor que estiver dentro da faixa de 25-75%. Usar a tabela de conversão para unidades Bethesda e multiplicar o valor encontrado pelo fator da diluição.

9. Interpretação dos resultados:

9.1 Uma unidade de inibidor / ml (unidade Bethesda) é definida como a quantidade de inibidor capaz de neutralizar 50% de FVIII contido em 1 ml de plasma.

9.2 Se a atividade do FVIII residual calculado for aproximadamente 100% (80-100%), a amostra de plasma não contém inibidor.

9.3 Se a atividade do FVIII residual calculado for menor que 60%, a amostra de plasma contém inibidor.

9.4 Amostras de plasma com valores entre 60-80% são consideradas limítrofes e novos testes devem ser realizados com amostras adicionais para estabelecer o diagnóstico.

10. Documentação:

10.1 Tabela de conversão para Unidades Bethesda.

11. Recomendações ou Precauções:

11.1 Observar os cuidados com biossegurança, conforme o Manual de Biossegurança do Hemocentro Regional de Maringá.

11.2 Trabalhar em ambiente climatizado entre 20 – 24°C.

12. Referências:

12.1 Dacie, J.V, & Lewis, S.M. "Practical Haematology". Churchill Livingstone, 2 ed, 1995.

TABELA DE CONVERSÃO PARA UNIDADES BETHESDA (UNIDADES DE INIBIDOR/ml)

% Fator VIII residual	Unidades de inibidor/ml	% Fator VIII residual	Unidades de inibidor/ml	% Fator VIII residual	Unidades de inibidor/ml
6	5,5	25	2,0	54	0,9
7	5,0	27	1,9	57	0,8
8	4,5	29	1,8	61	0,7
9	4,0	31	1,7	65	0,6
10	3,5	33	1,6	70	0,5
12	3,1	35	1,5	74	0,4
14	2,9	38	1,4	80	0,3
16	2,7	40	1,3	86	0,2
18	2,5	43	1,2	92	0,1
20	2,35	46	1,1	97	0,05
22	2,2	50	1,0	100	0,0

ANEXO G – POP Dosagem de Fibrinogênio

	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO DOSAGEM DE FIBRINOGENIO	LAB-HEMOS POP 006/00 Página: 1/3
---	--	---

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Revisado	Data	Rubrica
Elaboração	SandraSchiller	Jun/2007				
Verificação						
Aprovação						
Ciência da Garantia da Qualidade						
				Periodicidade: Revisão Anual		

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Item Alterado/Justificativa
Alteração				
Aprovação				

1.Princípio:

Este teste é realizado pelo método de Clauss, onde o plasma citratado é levado à coagulação através da conversão do fibrinogênio em fibrina com a adição de um excesso de trombina. Neste caso o tempo de coagulação depende largamente do teor de fibrinogênio na amostra.

2. Escopo:**2.1 Laboratório de Hemostasia****3. Responsabilidade:****3.1 Bioquímico e técnico de laboratório.****4. Amostra:**

4.1 Coletar amostra de sangue total em anticoagulante Citrato de Sódio 3,2%, sendo 9 partes de sangue para 1 parte de anticoagulante.

4.2 Centrifugar a 3000 rpm e a 10°C durante 15 minutos para a obtenção do plasma pobre em plaquetas. Separar o plasma sobrenadante usando uma pipeta Pasteur plástica retirando os três quartos superiores do sobrenadante.

4.3 A amostra é estável por 8 horas entre 15-25°C.

4.4 Caso o exame não seja realizado dentro deste período, congelar a amostra a – 80°C.

5. Reagentes e Materiais Necessários:

- 5.1 Reagente Multifibren® U
- 5.2 Plasma Humano Padrão – Dade Behring
- 5.3 Micropipeta automática de 50 µl
- 5.4 Micropipeta automática de 100 µl
- 5.5 Ponteiras descartáveis
- 5.6 Tubos de ensaio plásticos descartáveis
- 5.7 Cubetas para coagulômetro

6. Equipamentos:

- 6.1 Centrífuga refrigerada de bancada Spin VI - Incibrás
- 6.2 Coagulômetro Fibrintimer II – Dade Behring (FBT II)

7. Controles:

- 7.1 Plasma controle normal – Dade Behring

8. Procedimento:

8A Determinação da curva de referência – preparar as diluições conforme o esquema a seguir:

% Plasma Padrão	Diluição	Plasma Padrão(µl)	Solução Fisiológica (µl)
100%	1: 1	50	-
50%	1: 2	100	100
25%	1: 4	100 dil 1:2	100
12,5%	1: 8	100 dil. 1:4	100

8A.1 Dosar o fator de cada diluição conforme a técnica no item 8B.

8A.2 Converter os valores percentuais do Plasma Padrão de acordo com o valor de cada lote.

8A.3 Inserir os valores do Plasma Padrão e os respectivos tempos de coagulação na função Calibração, conforme descrito no manual do fabricante do equipamento FBT II.

8A.4 Uma nova curva de referência deve ser realizada sempre que se mudar o lote do reagente

Multifibren® U.

8B – Dosagem do Fibrinogênio

8.1 Reconstituir a trombina em água deionizada na quantidade indicada no rótulo. Aquecer a 37°C antes do uso.

8.2 Pré-aquecer as cubetas a 37°C no termobloco do FBT II.

8.3 Pipetar em uma cubeta pré-aquecida, 50 µl de plasma do paciente.

8.4 Incubar por 1 min a 37 °C.

8.5 Transferir a cubeta para o canal de leitura.

8.6 Adicionar 100 µl do reagente Multifibren® U, pré-aquecido a 37 °C.

8.7 Aguardar o término da leitura.

8.8 Imprimir o resultado acionando a tecla START (o tempo de coagulação será impresso em mg/dl).

8.8 Realizar o mesmo procedimento para o Plasma Controle Normal.

9. Interpretação dos resultados:

9.1. Valor de referência: 146 -380 mg/dl.

9.2. Níveis baixos de fibrinogênio encontram-se em casos de: hipofibrinogenemias ou afibrinogenemias congênitas ou adquiridas por coagulopatias de consumo, produção reduzida em doenças hepáticas agudas ou crônicas, perda no espaço intravascular (ascite, hemorragia aguda e queimaduras), aumento de degradação (choque ou carcinoma).

9.3. Níveis temporários de fibrinogênio elevados são encontrados como comportamento do fibrinogênio como “proteína de fase aguda” e podem ocorrer após cirurgias, trauma, infarte do miocárdio e infecções. Hiperfibrinogenemias persistentes podem ocorrer nas neoplasias e doenças inflamatórias crônicas.

10. Documentação: Não se aplica.

11. Recomendações ou Precauções:

11.1 Observar os cuidados com biossegurança, conforme o Manual de Biossegurança do Hemocentro Regional de Maringá.

11.2 Trabalhar em ambiente climatizado entre 20 – 24°C.

12. Referências:

12.1 Dacie, J.V, & Lewis, S.M. “Practical Haematology”. Churchill Livingstone, 2 ed, 1995.

12.2 Terra, P. “Coagulação – Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina”. Atheneu, 3 ed, 2004.

12.3 Bula do reagente Multifibren® U – Dade Behring

ANEXO H – POP Tempo de sangramento – método de Ivy

 HEMEPAR MARINGÁ	PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO TEMPO DE SANGRAMENTO - MÉTODO DE IVY	LAB-HEMOS POP 007/00 Página: 1/2.
---	---	--

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Revisado	Data	Rubrica
Elaboração	SandraSchiller	Jun/2007				
Verificação						
Aprovação						
Ciência da Garantia da Qualidade						
				Periodicidade: Revisão Anual		

Responsável :	Nome	Data	Rubrica	Item Alterado/Justificativa
Alteração				
Aprovação				

1. Princípio:

Uma incisão padronizada é feita na superfície interna do antebraço e o tempo de sangramento desta incisão é medido. A parada do sangramento indica a formação do tampão hemostático que é dependente do número de plaquetas e da sua capacidade de adesão e agregação.

2. Escopo:

2.1 Sala de coleta – Ambulatório de Hematologia

3. Responsabilidade:

3.1 Bioquímico e técnico de laboratório.

4. Amostra: Não se aplica**5. Reagentes e Materiais Necessários:**

- 5.1 Álcool 70%
- 5.2 Algodão
- 5.3 Micropore
- 5.4 Papel de filtro

5.5 Lancetas Triplett®
 5.6 Esfigmomanômetro
 5.7 Cronômetro

6. Equipamentos: Não se aplica

7. Controles: Não se aplica

8. Procedimento:

- 8.1 Selecionar o local da incisão no antebraço do paciente
- 8.2 Fazer a antisepsia no antebraço do paciente
- 8.3 Colocar o esfigmomanômetro na porção superior do braço do paciente.
- 8.4 Inflar o esfigmomanômetro até 40 mm Hg por 30 segundos antes do momento da incisão.
- 8.5 Remover o Triplett® da embalagem.
- 8.6 Posicionar o Triplett® no antebraço do paciente paralelo a posição antecubital.
- 8.7 Empurrar o gatilho (a lâmina rapidamente fará a incisão e retrairá automaticamente).
- 8.8 Acionar o cronômetro.
- 8.9 Após 30 segundos, absorver o sangue cuidadosamente, sem tocar na incisão, com um disco de papel de filtro.
- 8.10 Repetir o procedimento do item 8.9 a cada 30 segundos.
- 8.11 Parar o cronômetro quando o sangramento tiver cessado completamente
- 8.12 Remover o esfigmomanômetro e limpar a área da incisão.
- 8.13 Aplicar um curativo de micropore em forma de "ponto-falso".

9. Interpretação dos resultados:

- 9.1 O intervalo de referência normal estabelecido pelo fabricante para o Triplett® é de 1,5-7,0 minutos .
- 9.2 O tempo de Sangramento de Ivy pode estar aumentado nos seguintes casos: trombocitopenia; alterações da função plaquetária; Doença de VonWillebrand; anormalidades vasculares; ocasionalmente em deficiência grave de fator V ou XI e afribinogenemia.

10. Documentação: Não se aplica.

11. Recomendações ou Precauções:

- 11.1 Observar os cuidados com biossegurança, conforme o Manual de Biossegurança do Hemocentro Regional de Maringá.

12. Referências:

- 12.1 Dacie, J.V, & Lewis, S.M. "Practical Haematology". Churchill Livingstone, 2 ed, 1995.
- 12.2 Bula do Triplett® - Dispositivo padronizado para teste de tempo de sangramento.

ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética



Fundação Universidade Estadual de Maringá

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê Permanente de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

Registrado na CONEP em 10/02/1998

CAAE Nº 0180.0.093.093-06

PARECER Nº 233/2006

Pesquisador(a) Responsável: Sílvia Maria Tintori	
Centro/Departamento: Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM)	
Título do projeto: Estudo laboratorial de pacientes cadastrados no Hemocentro Regional de Maringá.	
Considerações: Trata-se de uma pesquisa, em conjunto, desenvolvida no Programa de Pós-graduação em pesquisa e desenvolvimento (Biotecnologia Médica) - Mestrado Profissional (Vinculada) Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP com a participação de Sandra de Souza Schiller e com orientação da Dra. Izoete Aparecida Thomazini Santos. O protocolo possui como objetivos: implantar o Laboratório de Hemostasia no Hemocentro Regional de Maringá (HRM), vinculado ao HUM, fazendo a validação dos testes e elaborando o MPOP; realizar os testes de screening – tempo de protombina, de tromboplastina parcial ativada, de sangramento e mistura nos pacientes portadores de coagulopatias atendidos no Ambulatório de Hematologia do HRM; realizar as determinações de rotina da dosagem de Fator VIII e IX; realizar a pesquisa de inibidor de fator de coagulação em todos os pacientes hemofílicos cadastrados no hemocentro e nos pacientes com pesquisa de inibitor positiva; levantar o número e o tipo de intercorrências clínicas nos hemofílicos com e sem inibidor e levantar o número de infusões e o tipo de fator de coagulação de reposição utilizado nos hemofílicos com e sem inibidor, em cada intercorrência. Para tanto se pretende implantar os exames, acima mencionados, de rotina laboratorial no HRM, onde serão avaliados 90 portadores de coagulopatias cadastrados e atendidos no ambulatório do HRM. O benefício oferecido aos sujeitos será o de ao determinar o tipo de hemofilia e a existência ou não de inibidor poder orientar corretamente o tratamento de reposição a ser escolhido pelo médico, melhorando a qualidade de vida dos hemofílicos. Quanto ao orçamento a pesquisadora declara que não haverá custos extraordinários, uma vez que estes exames que serão realizados fazem parte do protocolo de diagnóstico e monitoramento da doença. Apresenta cronograma e autorização do HUM. A pesquisadora e a mestrandia apresentam currículos com formação na área. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) se encontra de acordo com a Resolução 196/96-CNS, faltando apenas o endereço do comitê. Assim, somos de parecer favorável à aprovação com a recomendação de que seja acrescido ao final do TCLE o endereço deste Comitê.	
Situação: APROVADO COM RECOMENDAÇÃO	
CONEP: (x) para registro () para análise e parecer Data: 01/09/2006	
O pesquisador deverá apresentar Relatório Final para este Comitê em: 30/04/2007	
O protocolo foi apreciado de acordo com a Resolução nº 196/96 e complementares do CNS/MS, na 121ª reunião do COPEP em 01/09/2006.	 Prof. Dr. Valter Augusto Della Rosa Presidente do COPEP

Em suas comunicações com esse Comitê cite o número de registro de seu CAAE.
 Bloco 10 sala 01 – Avenida Colombo, 5790 – CEP: 87020-900 – Maringá - PR
 Fone-Fax: (44) 3261-4444 – e-mail: coep@uem.br