



Factor II

Deficient Plasma

Para a determinação coagulométrica em um estágio do fator II

SIGNIFICADO CLÍNICO

A protrombina ou fator II (FII) é o precursor da serina-protease trombina, enzima fundamental da coagulação. É sintetizada no fígado como pró-péptido formando parte dos fatores vitamina K dependentes.

A deficiência em fator II pode ser hereditária ou adquirida. As deficiências hereditárias são herdadas em forma autossômica recessiva e podem ser de duas classes: hipoprotrombinemia ou desiprotrombinemia. O déficit adquirido pode ser devido à presença de inibidores específicos ou estar associado ao déficit de outros fatores como no caso de tratamento com antagonistas de vitamina K, hipovitaminose K, dano no fígado, coagulação intravascular disseminada, etc.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A determinação quantitativa do fator II envolve a medição do tempo de coagulação de uma amostra diluída contendo o fator a determinar, utilizando um plasma deficiente que fornece os fatores restantes em níveis apropriados com exceção do fator II, em presença de tromboplastina cálcica (Tempo de Protrombina em um estágio). O tempo de coagulação obtido é inversamente proporcional à atividade do fator II na amostra.

O método pode ser utilizado com qualquer instrumento capaz de realizar provas de valorações de fatores baseados no Tempo de Protrombina.

REAGENTES FORNECIDOS

A. Reagente A: plasma humano liofilizado deficiente em fator II obtido por imunoabsorção, com uma atividade de coagulação < 1% de FII.

INSTRUÇÕES DE USO

Dissolver o Reagente A com o volume de água destilada indicado no frasco. Deixar repousar por até 30 minutos a temperatura ambiente e depois homogeneizar a solução por agitação suave antes de usar.

REAGENTES NÃO FORNECIDOS

- Água destilada
- Imidazole Buffer da Wiener lab.
- Soluplastin da Wiener lab ou outros reagentes de TP
- Coagulation Control N e Coagulation Control P da Wiener lab.
- Coagulation Calibrator da Wiener lab.

PRECAUÇÕES

- O reagente é para uso diagnóstico "in vitro".
- O plasma foi preparado partindo de material não reativo

para HBsAg, HCV e HIV. No entanto, o reagente e todas as amostras de sangue devem ser manipuladas como material potencialmente contaminado.

Utilizar os reagentes observando as precauções habituais de trabalho no laboratório de análises clínicas.

Todos os reagentes e as amostras devem ser descartadas conforme à regulação local vigente.

ESTABILIDADE E INSTRUÇÕES DE ARMAZENAMENTO

O Factor II Deficient Plasma é estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem.

Uma vez reconstituído o reagente é estável 2 horas a temperatura ambiente (< 25°C) ou 1 mês congelado (-20°C). Evite congelamento e descongelamento repetido.

O reagente congelado deve ser descongelado durante pelo menos 10 minutos a 37°C e homogeneizado antes de usar.

AMOSTRA

Plasma citratado

a) Coleta: obter sangue cuidadosamente (evitando estase ou trauma), e colocar num tubo com anticoagulante na proporção 9 + 1 exata (exemplo: 4,5 ml de sangue + 0,5 ml de anticoagulante). Misturar suavemente. Centrifugar durante 15 minutos e separar o plasma antes de 30 minutos. É recomendável proceder à extração com seringas plásticas.

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

c) Estabilidade e instruções de armazenamento: o plasma deve ser conservado a temperatura ambiente até o momento de realizar a prova. Este período não deve prolongar-se mais que 4 horas. Caso não seja possível realizar a prova na hora, o plasma pode ser conservado por até 2 semanas a -20°C. Neste caso, a amostra deve ser congelada imediatamente e descongelada rapidamente a 37°C, não devendo prolongar este período mais que 10 minutos.

INTERFERÊNCIAS

Não deve ser utilizado EDTA ou heparina para obter plasma. As contaminações, visíveis ou não, são a causa de tempos falsamente prolongados.

Hemólise e lipemias visíveis dificultam a medição foto-óptica dos resultados.

Referência bibliográfica de Young para efeitos de drogas neste método.

MATERIAL NECESSÁRIO (não fornecido)

- Tubos de hemólise.

- Pipetas e micropipetas para medir os volumes indicados.
- Banho-maria a 37°C.
- Cronômetro.
- Espectrofotômetro ou analisador de coagulação.

PROCEDIMENTO

I- CURVA DE CALIBRAÇÃO

1- Realize uma diluição 1:5 do Coagulation Calibrator em Imidazole Buffer (1 parte de Calibrador + 4 partes de Imidazole Buffer). A partir de esta diluição, prepare diluições geométricas com Imidazole Buffer (1:1 a 1:32). A proporção 1:1 corresponde à diluição 1:5 do calibrador, portanto as diluições serão: 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160. O Calibrador diluído 1:10 representa o 100% do valor estabelecido para o fator II na tabela de valores do calibrador.

2- Pré-aqueça o reagente de TP (Soluplastin de Wiener lab) a 37°C.

3- Em um tubo de hemólise coloque:

Reagente A	100 ul
Diluições do Calibrador	100 ul

4- Misture e incube por até 1 minuto a 37°C.

5- Dispare o cronômetro quando adicionar 200 ul de reagente TP pré-aquecido e registre o tempo de formação do coágulo.

6- Calcule o tempo médio de coagulação para cada diluição, em duplicado.

7- Grafique a curva de calibração representando os tempos de coagulação vs. atividade do fator II, em papel log-log. Uma através de uma linha reta os pontos representados. A reta resultante deve conter pelo menos 3 pontos consecutivos.

A atividade de fator II em cada diluição é determinada multiplicando o % FII do Coagulation Calibrator pelo fator de diluição. Exemplo para um valor estabelecido de 98% no Coagulation Calibrator:

Diluição do Coagulation Calibrator (pré-diluído 1:5)	Diluição Final	Cálculo de FII (%)	Fator II (%)
1:1	1:5	98 x 2	196
1:2	1:10	98 x 1	98
1:4	1:20	98 x 0.5	49
1:8	1:40	98 x 0.25	24.5
1:16	1:80	98 x 0.125	12.3
1:32	1:160	98 x 0.063	6.1

II- AMOSTRAS DE PACIENTES

1- Prepare diluições 1:10 dos plasmas de pacientes com Imidazole Buffer (1 parte de amostra + 9 partes de

Imidazole Buffer).

2- Pré-aqueça o reagente de TP (Soluplastin de Wiener lab.) a 37°C.

3- Em um tubo de hemólise coloque:

Reagente A	100 ul
Amostra	100 ul

4- Misture e incube por até 1 minuto a 37°C

5- Dispare o cronômetro quando adicionar 200 ul de reagente TP pré-aquecido e registre o tempo de formação do coágulo.

6- Repita a determinação e promedie o resultado para cada amostra.

CALCULO DOS RESULTADOS

Os valores das amostras de plasma diluídas 1:10 devem ser interpoladas na curva de calibração.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Se a atividade do fator II obtido por interpolação direta da curva de calibração é menor do que o ponto mais baixo da curva, deve repetir a determinação com uma diluição menor (1:5) e multiplicar o resultado por 0,5.

Se a atividade do fator II obtido por interpolação direta da curva de calibração é maior do que o ponto mais alto da curva, deve repetir a determinação com uma diluição maior (1:20) e multiplicar o resultado por 2.

MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Coagulation Control N e Coagulation Control P de Wiener lab. O controle deve ser processado da mesma maneira do que as amostras.

VALORES DE REFERÊNCIA

70-120 %

Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores de referência de acordo com as técnicas e equipamento utilizado.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Vide Estabilidade e instruções de armazenamento em AMOSTRA e INTERFERÊNCIAS.

Conservar as amostras de plasma a temperatura ambiente para evitar a ativação por baixa temperatura.

É recomendável respeitar o tempo de incubação das amostras com o Reagente A.

O manuseio inadequado das amostras pode causar ativação parcial de fatores de coagulação que causaria um resultado errôneo na determinação.

O anticoagulante lítico pode afetar a determinação da atividade do fator.

Uma nova calibração é necessária para cada lote de reagentes e para cada instrumento utilizado.

DESEMPENHO

a) Reprodutibilidade: a precisão foi determinada com

diferentes amostras (em série e dia a dia). Os seguintes resultados foram obtidos:

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
26,8 seg	0,738 seg	2,76%
28,0 seg	0,680 seg	2,43%
25,8 seg	0,249 seg	0,96%

Precisão inter-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
34,8 seg	0,153 seg	0,44%
33,8 seg	0,862 seg	2,55%
36,0 seg	1,041 seg	2,89%

b) Faixa de medição: 6-150%

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

Para a programação consultar o manual de uso do analisador a ser utilizado.

APRESENTAÇÃO

- 5 x 1 ml (Cód. 1705014).

REFERÊNCIAS

- Goldenfarb MD (1971) Reproducibility in Coagulation Assays, AJCP, 55:561-564.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Haemostasis Assays: Approved Guideline, 5th ed. CLSI: H21-A5.
- Triplett DA, (1981) New Methods in Coagulation, Crit Rev Clin Lab Sci. 1981;15 (1):25-84.
- Young, D.S. - "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", AACC Press, 4th ed. 2001.

SÍMBOLOS

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



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

- Representante autorizado na Comunidade Europeia
- Uso médico-diagnóstico "in vitro"
- Conteúdo suficiente para <n> testes
- Data de validade
- Limite de temperatura (conservar a)
- Não congelar
- Risco biológico
- Volume após a reconstituição
- Conteúdo
- Número de lote
- Elaborado por:
- Nocivo
- Corrosivo / Caústico
- Irritante
- Consultar as instruções de uso
- Calibrador
- Controle
- Controle Positivo
- Controle Negativo
- Número de catálogo

Wiener lab.

2000 Rosario - Argentina