



Factor VIII

Deficient Plasma

Para a determinação coagulométrica em um estágio do fator VIII

SIGNIFICADO CLÍNICO

O fator VIII (FVIII), uma proteína chave na hemostase sanguínea, circula ligada ao fator von Willebrand (FVW), que estabiliza e protege da proteólise inespecífica do plasma. A adesão do FVW ao subendotélio ajuda a aumentar a concentração e a ativação de FVIII no sítio da lesão vascular. A deficiência em fator VIII pode ser hereditária ou adquirida. As anomalias congênitas estão associadas com dois dos distúrbios hemorrágicos mais comuns, a hemofilia A e a doença de von Willebrand. Na hemofilia A, o defeito pode ser causada por alterações qualitativas ou quantitativas do FVIII. As deficiências adquiridas podem ser devido à presença de inibidores específicos ou inespecíficos ou o consumo de fatores como no caso da coagulação intravascular disseminada.

FUNDAMENTOS DO MÉTODO

A determinação quantitativa do fator VIII 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 VIII, em presença de fosfolipídios, superfícies de cargas negativas e cálcio (tempo de tromboplastina parcial ativada: aPTT). O tempo de coagulação obtido é inversamente proporcional à atividade do fator VIII na amostra. O método pode ser utilizado com qualquer instrumento capaz de realizar provas de valorações de fatores baseados no tempo de tromboplastina parcial ativada.

REAGENTES FORNECIDOS

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

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.
- APTT ellagic da Wiener lab.
- 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 Reagente A 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 VIII Deficient Plasma** é estável sob refrigeração (2-10°C) até a data de vencimento indicada na embalagem. Uma vez reconstituído o reagente é estável 3 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

Utilize Coagulation Calibrator da Wiener lab. e Imidazole Buffer como diluente.

- 1- Para obter o ponto de calibração mais alto, faça uma diluição 3:20 do Coagulation Calibrator misturando 1.5 partes de calibrador + 8.5 partes de Imidazole Buffer. Para obter o próximo ponto, faça uma diluição de 1/10 do Coagulation Calibrator, misturando 1 parte do calibrador + 9 partes do Imidazole Buffer. Os pontos de calibração subsequentes são obtidos a partir do anterior (diluição 1:10) fazendo as seguintes diluições geométricas no Imidazole Buffer: 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. O Calibrador diluído 1:10 representa o 100% do valor estabelecido para o fator VIII. Veja como calcular o restante das atividades para cada ponto de calibração na tabela mostrada abaixo.
- 2- Pré-aqueça o cloreto de cálcio 25 mM (Reagente B APTT ellagic da Wiener lab) a 37°C.
- 3- Em um tubo de hemólise coloque:

Reagente A	100 ul
Diluições do Calibrador	100 ul
Reagente aPTT (Reagente A)	100 ul

- 4- Misture e incube por até 3 minutos a 37°C.
- 5- Dispare o cronômetro quando adicionar 100 ul de cloreto de cálcio 25 mM pré-aquecido e registre o tempo de formação do coágulo.
- 6- Calcule o tempo promédio de coagulação para cada diluição, em duplicado.
- 7- Grafique a curva de calibração representando os tempos de coagulação vs. atividade do fator VIII, em papel log-log. Una através de uma linha reta os pontos representados. A reta resultante deve conter pelo menos 3 pontos consecutivos.

A atividade de fator VIII em cada diluição é determinada multiplicando o % FVIII do Coagulation Calibrator pelo fator de diluição indicado na tabela. Exemplo para um valor estabelecido de 105% no Coagulation Calibrator:

Diluição do Coagulation Calibrator	Diluição Final	Cálculo de FVIII (%)	Atividade FVIII (%)
1.5:1	1.5	105 x 1.5	157.5
1:1	1.0	105 x 1.0	105
1:2	0.5	105 x 0.5	52.5
1:4	0.25	105 x 0.25	26.3

1:8	0.125	105 x 0.125	13.1
1:16	0.063	105 x 0.063	6.6

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 cloreto de cálcio 25 mM (Reagente B APTT ellagic da Wiener lab.) a 37°C.
- 3- Em um tubo de hemólise coloque:

Reagente A	100 ul
Amostra diluída	100 ul
Reagente aPTT (Reagente A)	100 ul

- 4- Misture e incube por até 3 minutos a 37°C
- 5- Dispare o cronômetro quando adicionar 100 ul cloreto de cálcio 25 mM 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 VIII 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 VIII 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 da Wiener lab. O controle deve ser processado da mesma maneira do que as amostras.

VALORES DE REFERÊNCIA

50-150 %

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 lúpico pode afetar a determinação da atividade do fator.

Se houver suspeita a presença de inibidores de FVIII, devem ser processadas várias diluições diferentes da amostra.

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

DESEMPENHO

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

Precisão intra-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
43,4 seg	0,31 seg	0,72%
52,8 seg	0,57 seg	1,08%

Precisão inter-ensaio

Nível	D.P.	C.V.
43,4 seg	0,47 seg	1,08%
52,8 seg	0,75 seg	1,43%

b) Faixa de medição: 5-170%

PARÂMETROS PARA ANALISADORES AUTOMÁTICOS

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

APRESENTAÇÃO


- 5 x 1 ml (Cód. 1705017)

REFERÊNCIAS

- Verbruggen B - Diagnosis of factor VIII deficiency, Haemophilia, 14 (3): 76-82 (2008).
- Barrowcliffe T - Standardization of FVIII & FIX assays, Haemophilia, 9: 397-402 (2003).
- Bach J - Sources of variation in factor VIII, von Willebrand factor and fibrinogen measurements: Implications for detecting deficiencies and increased plasma levels, Thrombosis Research, 126, e188- e195 (2010).
- 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 - New Methods in Coagulation, Crit Rev Clin Lab Sci. 1981;15 (1):25-84 (1981).
- 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