
TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Quando Usar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ Como Executar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ TP pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ TTPA pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ Tempo de Trombina e Fibrinogênio pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo
 - ✓ Teste de Fibrinogênio Derivado de TP
-

Existem vantagens em usar coagulômetros para testes de coagulação, incluindo velocidade de análise/produzitividade e consistência da análise, que proporcionam resultados precisos e exatos em tempo hábil. Embora muitos instrumentos diferentes para testes de coagulação estejam disponíveis e em uso em todo o mundo, a técnica de inclinação manual do tubo ainda pode ser empregada com sucesso para determinação do tempo de coagulação. Isso pode ser feito para todas as amostras, caso não haja um método automatizado adequado disponível, ou para um subgrupo de amostras, seja porque a análise automatizada não gera resultados em amostras com características específicas, causando incompatibilidade da amostra com o instrumento em uso, ou porque o método do coagulômetro está temporariamente indisponível. Métodos de inclinação do tubo são adequados como alternativas aos métodos baseados em coágulos, e mesmo laboratórios de centros de hemofilia abrangentes devem ter o método de inclinação manual do tubo disponível para as poucas amostras em que a análise automatizada não funcionar, mas cujos resultados forem realmente necessários para o manejo seguro do paciente. Isso pode ocorrer na presença de concentrações plasmáticas de lipídios muito elevadas ou quando o padrão de formação de coágulos na amostra difere acentuadamente das amostras normais, particularmente quando a polimerização de fibrinogênio em fibrina é acentuadamente anormal. Em razão das muitas variáveis e possíveis fontes de contaminação associadas às técnicas manuais, estas podem exigir testes duplicados. Se o CV entre dias dos resultados do CQI for >5%, deve-se considerar a realização de testes duplicados. Quando os testes forem realizados em duplicata, os dois resultados devem estar dentro de +/- 5% da média com a prática.

Quando Usar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo: o método de inclinação manual do tubo pode ser usado com sucesso para determinação de TP, TTPA, tempo de trombina e fibrinogênio, bem como em ensaios de fatores de coagulação baseados em TP e TTPA.

Como Executar a Técnica de Inclinação Manual do Tubo: o método de execução da técnica de inclinação do tubo para testes de coagulação foi recentemente harmonizado em relação ao teste de TP como parte da calibração de tromboplastinas de referência para o sistema de razão normalizada internacional (RNI) usado para monitorar medicamentos antagonistas da vitamina K (Van den Besselaar et al, 2020). Esse método harmonizado melhorou a concordância entre os resultados de TP com inclinação do tubo quando o teste é realizado por diferentes operadores e em diferentes centros. Esse método pode ser usado para testes com inclinação do tubo para análise de TTPA, tempo de trombina e fibrinogênio, além do teste de TP.

Materiais necessários:

- 1) Banho-maria para manter os tubos de ensaio em temperatura constante de 37°C. Dimensões próximas a 40 x 30 x 20 cm são convenientes. A água no banho deve ser circulada continuamente por uma bomba, se possível. A temperatura deve ser de 37°C (limites de tolerância: 37 ± 0,5°C). A temperatura deve ser controlada com um termômetro calibrado.
- 2) Fonte de luz, como uma luminária articulada, colocada 20 cm acima do nível da água, pode ser usada para iluminar o tubo de ensaio durante a inclinação, o que facilita a detecção do coágulo no ponto final

pelo operador. O uso de LED como fonte de luz é preferível às lâmpadas que geram calor, pois podem elevar a temperatura dos tubos de ensaio mantidos próximos à fonte de luz.

- 3) Os tubos de ensaio devem ser tubos de vidro não siliconizados sem uso. Tubos de cultura descartáveis (código de catálogo 73500-1275, Kimble Chase Life Science and Research Products LLC, Vineland, Nova Jersey) com dimensões de 75 x 12 mm e espessura de parede de 0,8 mm foram utilizados no trabalho para harmonizar os testes de inclinação de tubo de TP (van den Besselaar et al, 2020), mas tubos de 75 x 10 mm também podem ser utilizados. Os tubos de ensaio devem ser feitos de vidro borossilicato. Os tubos de ensaio devem ser descartados após o uso e não devem ser lavados para reutilização. Diferentes fontes de tubos de ensaio de vidro podem ser usadas com sucesso, mas podem influenciar os tempos de coagulação obtidos, particularmente em testes de triagem como TTPA. Se a fonte (fabricante ou composição) dos tubos de ensaio for alterada, deve-se considerar a possibilidade de que os resultados tenham sido influenciados. Isso pode ser avaliado comparando um pequeno número de testes, como o de TTPA, com os dois tipos de tubo. Se houver diferenças sistemáticas, uma nova faixa normal deve ser estabelecida.

Técnica:

- A temperatura do ambiente no qual o equipamento está instalado e onde a técnica será executada deve ser mantida em 20-22°C.
- Antes de iniciar os testes manuais de TP, TTPA, TT ou fibrinogênio em banho-maria, a temperatura deve ser verificada e posteriormente registrada.
- Os tubos de ensaio vazios devem ser mantidos na posição vertical em um suporte dentro do banho-maria, a 37°C por pelo menos 4 minutos a uma profundidade de 3,5 cm, antes da adição dos reagentes e do plasma.

TP pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo:

- Para o teste de TP, adicione 200 µL do reagente de tromboplastina/cálcio e incube por 2 minutos.
- Em seguida, pipete 100 µL de plasma não pré-aquecido, dispensando a uma altura de 1 cm acima do nível de tromboplastina, com a ponteira apoiada na parede do tubo de ensaio, e acione imediatamente o cronômetro com a outra mão.
- Agite o tubo suavemente para misturar o conteúdo, com o tubo imerso na água.
- Coloque o tubo no suporte dentro do banho-maria.
- Deite a pipeta.
- O tubo de ensaio deve ser mantido manualmente na água, com a água cobrindo 5 cm do fundo do tubo (Figura 1).
- A inclinação manual do tubo deve começar 7 segundos após o início do cronômetro.
- O tubo deve ser inclinado em um ângulo de aproximadamente 90°, retirando-o da água por 2 segundos e colocando-o novamente na água por 1 segundo (Figura 1). Observe que inclinar o tubo em 90° ou mais geralmente causará o derramamento da mistura de reação do tubo.
- O tubo não deve ficar parado durante esse ciclo, mas sim inclinado continuamente com a mão do operador apoiada na lateral do banho-maria.
- Esse ciclo é repetido até a formação do coágulo.
- Na posição horizontal, o tubo é mantido a uma altura não superior a 10 cm e não inferior a 2 cm acima do nível da água (Figura 1).
- Antes da mistura coagular, o operador observa a mistura fluindo do fundo para três quartos do comprimento do tubo na posição quase horizontal e retornando ao fundo.
- Quando a coagulação começa, a velocidade do fluxo é reduzida.
- Quando o fluxo é interrompido, o operador para o cronômetro e registra o tempo de coagulação em segundos com precisão de uma casa decimal.

O operador que executa a técnica de inclinação manual do tubo levanta o tubo de ensaio regularmente para fora da água. Retirar o tubo de ensaio da água resultará em uma queda de temperatura da mistura de reação. Imergir o tubo novamente na água resultará em um aumento de temperatura. A queda média de temperatura observada

na técnica de inclinação manual do tubo, utilizando o método descrito acima, é limitada a 0,4°C (van den Besselaar et al, 2020).

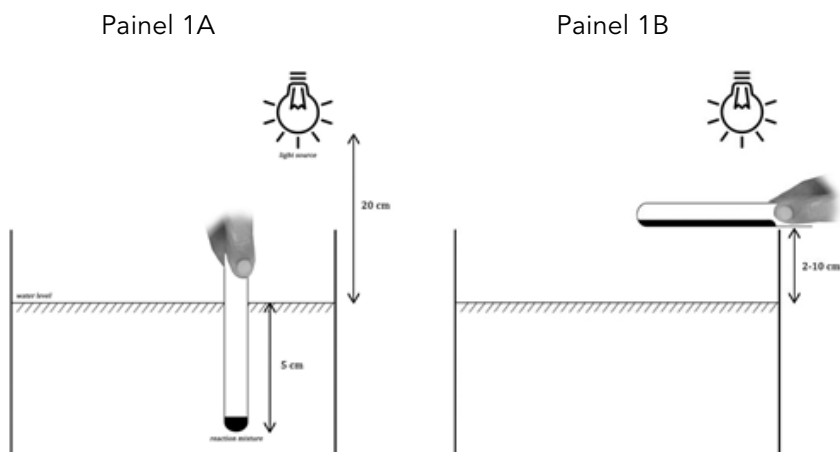


Figura 1. Representação esquemática da técnica de inclinação manual do tubo. Painel 1A: o tubo de ensaio está na posição vertical dentro do banho-maria. Painel 1B: o tubo de ensaio está na posição horizontal fora do banho-maria. A mão do operador está apoiada na borda do banho-maria. Devido à variação no tamanho das mãos dos operadores, a distância do tubo na posição horizontal até a superfície da água varia entre 2 e 10 cm. As dimensões da imagem não estão em escala. (Reproduzido com permissão da Elsevier Publishing, Amsterdã, Holanda, de: Van den Besselaar et al. J Thromb Haemost. 2020; 18: 1986-1994).

O método harmonizado acima foi desenvolvido em dois workshops, avaliando testes de TP por até sete operadores de três centros, que identificaram diversas variáveis na técnica (van den Besselaar et al, 2020). Em particular, os workshops confirmaram que a dispensação do componente final da mistura de reação para iniciar a coagulação no alto da parte de cima do tubo de ensaio estava associada a tempos de coagulação mais longos do que a dispensação próxima à superfície da mistura de reação na parte de baixo do tubo. Utilizando o método harmonizado descrito, o CV de Ts entre operadores nos mesmos plasmas de teste foi de 3% para TP normal e 1,4% para TP prolongado.

TTPA pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo:

- Adicione 100 µL de reagente de TTPA ao tubo e incube por 2 minutos.
- Em seguida, pipete 100 µL de plasma não pré-aquecido, dispensando a uma altura de 1 cm acima do nível do reagente de TTPA, com a ponteira apoiada na parede do tubo de ensaio, e acione imediatamente um cronômetro com a outra mão.
- Agite o tubo suavemente para misturar o conteúdo, com o tubo imerso na água.
- Coloque o tubo no suporte dentro do banho-maria.
- Após o tempo de ativação recomendado pelo fabricante do reagente de TTPA (geralmente 3 minutos, mas pode ser 5 minutos para outros), adicione 100 µL de cloreto de cálcio pré-aquecido a 37°C em um tubo separado no banho-maria, dispensando a uma altura de 1 cm acima do nível da mistura de reação, com a ponteira apoiada na parede do tubo de ensaio, e acione imediatamente um novo cronômetro com a outra mão.
- Agite o tubo suavemente para misturar o conteúdo, com o tubo imerso na água.
- Coloque o tubo no suporte dentro do banho-maria.
- Deite a pipeta.
- O tubo de ensaio deve ser mantido manualmente na água, com a água cobrindo 5 cm do fundo do tubo (Figura 1).
- A inclinação manual do tubo deve começar 15 segundos após o início do cronômetro.

- O tubo deve ser inclinado em um ângulo de aproximadamente 90°, retirando-o da água por 2 segundos e colocando-o novamente na água por 1 segundo (Figura 1). Observe que inclinar em 90° ou mais geralmente causará o derramamento da mistura de reação do tubo.
- O tubo não deve ficar parado durante esse ciclo, mas sim inclinado continuamente com a mão do operador apoiada na lateral do banho-maria.
- Esse ciclo é repetido até a formação do coágulo.
- Na posição horizontal, o tubo é mantido a uma altura não superior a 10 cm e não inferior a 2 cm acima do nível da água (Figura 1).
- Antes da mistura coagular, o operador observa a mistura fluindo do fundo para três quartos do comprimento do tubo na posição quase horizontal e retornando ao fundo.
- Quando a coagulação começa, a velocidade do fluxo é reduzida.
- Quando o fluxo é interrompido, o operador para o cronômetro e registra o tempo de coagulação em segundos com precisão de uma casa decimal.

Tempo de Trombina e Fibrinogênio pela Técnica de Inclinação Manual do Tubo: os métodos de inclinação manual do tubo devem usar as proporções de reagentes e plasma ou diluições de plasma recomendadas pelo fabricante do reagente e seguir os princípios dos métodos descritos para TP/TTPA acima.

Amostras com lipemia: muitos coagulômetros em uso atualmente, que utilizam pontos finais foto-ópticos para análise, são muito tolerantes a altos níveis de lipídios nas amostras. No entanto, as amostras podem ocasionalmente apresentar um nível tão alto de lipídios que o analisador não consegue detectar a formação de coágulo. Essas amostras podem ser analisadas manualmente e geralmente produzem um coágulo sólido que pode ser observado visualmente para TP, TTPA e tempo de trombina. Pode ser difícil observar a formação de coágulo durante a análise de fibrinogênio de Clauss dessas amostras. Se esse for o caso, outra opção é submeter as amostras a centrifugação a 10.000 g por 10 minutos em temperatura ambiente, se disponível (orientação do ICSH; Kitchen et al, 2021). Após essa ultracentrifugação, o lipídio é sedimentado e a amostra pode ser analisada em um coagulômetro automatizado, se disponível, ou pela técnica de inclinação manual do tubo para TP, TTPA, tempo de trombina ou fibrinogênio.

Amostras com anormalidades de fibrinogênio: a formação de coágulo pode ser alterada na presença de algumas anormalidades de fibrinogênio. Por exemplo, o fibrinogênio Longmont está associado a um coágulo fraco e translúcido durante o ensaio de fibrinogênio de Clauss. Sistemas foto-ópticos que monitoram a luz espalhada à medida que o coágulo se forma (ao contrário do monitoramento de luz transmitida) podem não conseguir detectar o ponto final. Essas amostras podem ser analisadas pelo método de inclinação do tubo, mas o operador tem que saber que a formação do coágulo pode ser difícil de discernir visualmente. Para algumas amostras de disfibrinogenemia em que a análise automatizada não funciona, a técnica manual deve ser realizada com um escrutínio muito cuidadoso do processo de coagulação, visto que os coágulos podem ser frágeis e facilmente rompidos por mistura/inclinação adicional após a formação do coágulo inicial.

Controle de qualidade: o material de controle de qualidade descrito em outra parte deste manual para TP, TTPA, tempo de trombina e fibrinogênio é adequado para uso com métodos de teste manuais. É aceitável testar um único nível de CQI, sendo a técnica manual reservada para amostras ocasionais que não passam na análise automatizada. Dois níveis devem estar disponíveis e ser testados de acordo com os critérios descritos neste manual, sendo o teste manual o principal procedimento analítico no laboratório.

A variação dos resultados de CQI obtidos por um pequeno grupo de operadores experientes na técnica de inclinação manual do tubo deve ser tipicamente a seguinte:

Média de +/- 1 segundo para CQ com TP médio na faixa de 10 a 12 segundos,

Média de +/- 2,5 segundos para CQ com TTPA médio na faixa de 25 a 30 segundos,

Média de +/- 2,5 segundos para CQ com tempo de trombina médio na faixa de 12 a 20 segundos,

Média de +/- 0,5 g/L para CQ com fibrinogênio médio de 2,5 a 3 g/L

Faixas normais: os resultados de testes manuais geralmente são diferentes daqueles gerados por coagulômetros. Normalmente, os tempos de coagulação para TP e TTPA são menores em analisadores que usam foto-óptica para monitorar a coagulação em comparação com os resultados obtidos manualmente. O grau de diferença não é consistente entre os diferentes analisadores que podem usar luz transmitida ou espalhada. Os analisadores monitoram alterações na dispersão/transmissão de luz ao longo do tempo após o início da coagulação e registram o tempo de coagulação como o tempo necessário para ultrapassar um limiar específico de alteração. Pode ser um limiar baixo de 3% de alteração em relação ao valor basal ou um limiar alto de 50% de alteração. Quanto menor a % de alteração usada na análise da curva de coagulação, menor o tempo de coagulação relatado. Isso significa que os resultados dos testes manuais não devem ser relatados junto com a faixa de referência estabelecida para uma técnica automatizada, mesmo quando os mesmos reagentes forem usados. Existem duas opções para resolver esse problema. Uma é estabelecer uma faixa de referência para a técnica manual usando o processo descrito em outra parte deste manual. Isso deve ser feito se todos os testes no laboratório forem realizados com técnicas manuais. Mais frequentemente, o teste manual é restrito a um pequeno subgrupo de amostras em que a análise automatizada não funcionou. Nesse caso, a maioria dos resultados liberados pelo laboratório será divulgada com a faixa de referência automatizada relevante. É prejudicial para os usuários do serviço ver resultados ocasionais de TP ou TTPA divulgados com uma faixa de referência diferente. Nesse caso, o laboratório pode adotar uma abordagem pragmática e usar uma tabela de conversão conforme descrito abaixo, de modo que o teste é realizado por técnica manual, mas o resultado do teste é convertido no resultado que teria sido obtido se a amostra tivesse sido analisada pelo método automatizado.

Conversão de Resultados Manuais de TP, TTPA e Tempo de Trombina em Números Equivalentes Automatizados: uma série de 20 a 30 amostras, abrangendo uma faixa de resultados normais e anormais, deve ser testada usando métodos manuais e automatizados. Os dados devem ser analisados por meio de análise de regressão para estabelecer a relação entre os resultados obtidos pelos dois métodos. Deve haver uma correlação significativa entre os resultados, com coeficiente de correlação >0,8. Nesse caso, a relação de regressão pode ser usada para criar uma tabela que mostre o resultado manual e o resultado equivalente que teria sido obtido no sistema automatizado. Quando um teste manual é realizado, o resultado manual é convertido no resultado automatizado, que é então relatado junto com a faixa de referência habitual do método automatizado. Isso significa que os usuários do serviço verão apenas uma única faixa de referência para TP, TTPA ou tempo de trombina. Isso é importante, pois essas faixas de referência provavelmente serão incorporadas aos protocolos clínicos utilizados no manejo de pacientes. A Tabela 5 mostra os resultados manuais e automatizados obtidos testando as mesmas 21 amostras com os dois métodos.

Tabela 5. TTPAs manuais e automatizados nas mesmas amostras

Número da amostra	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	Número da amostra	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
1	31,7	27,0	12	31,7	30,1
2	51,1	46,9	13	31,9	28,9
3	27,2	26,5	14	36,2	33,2
4	42,2	39,4	15	33,1	28,5
5	34,5	30,4	16	40,0	36,4
6	44,2	43,2	17	37,1	30,7
7	33,0	30,5	18	29,2	25,6
8	31,9	30,0	19	35,2	28,1
9	22,2	19,6	20	37,1	34,7
10	34,0	27,8	21	36,5	31,4
11	32,5	31,3			

A relação de regressão linear entre os dois conjuntos de dados é calculada usando um pacote estatístico. Nesse exemplo, o coeficiente de correlação (r) é 0,96 e a relação de regressão é calculada como:

$$y = 0,9551x - 1,887$$

onde

y é o TTPA automatizado

x é o TTPA manual

0,9551 é a inclinação da reta de regressão linear

- 1,887 é o intercepto em y.

Essa equação é usada para obter o TTPA automatizado a partir do TTPA determinado manualmente de qualquer amostra de teste. É conveniente elaborar uma tabela relacionando o TTPA manual ao resultado equivalente automatizado. A Tabela 6 foi derivada com o uso da equação de regressão acima.

Tabela 6. Tabela de conversão: TTPA manual para TTPA equivalente automatizado

TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)	TTPA manual (seg)	TTPA automatizado (seg)
19	16,3	40	36,3	61	56,4
20	17,2	41	37,3	62	57,3
21	18,2	42	38,2	63	58,3
22	19,1	43	39,2	64	59,2
23	20,1	44	40,1	65	60,2
24	21,0	45	41,1	66	61,2
25	22,0	46	42,0	67	62,1
26	22,9	47	43,0	68	63,1
27	23,9	48	44,0	69	64,0
28	24,9	49	44,9	70	65,0
29	25,8	50	45,9	71	65,9
30	26,8	51	46,8	72	66,9
31	27,8	52	47,8	73	67,8
32	28,7	53	48,7	74	68,8
33	29,6	54	49,7	75	69,8
34	30,6	55	50,7	76	70,7
35	31,5	56	51,6	77	81,7
36	32,5	57	52,6	78	82,6
37	33,4	58	53,5	79	73,6
38	34,4	59	54,5	80	74,5
39	35,4	60	55,4		

Ensaio manual de fibrinogênio de Clauss: os reagentes e métodos utilizados no ensaio manual de fibrinogênio de Clauss são os mesmos da versão automatizada (ou seja, mesma diluição de tampão, trombina e amostra de teste). O tempo de coagulação dos testes manuais é convertido em concentração de fibrinogênio usando uma curva de calibração. A curva de calibração deve ser construída com o mesmo calibrador e as mesmas diluições de calibrador que seriam usados nos testes automatizados (consulte a seção sobre ensaio de Clauss em outra parte deste manual), mas os tempos de coagulação de cada diluição de calibrador usada para construir a curva de calibração são determinados manualmente. Os resultados são, portanto, convertidos em concentração de fibrinogênio e o resultado é relatado no mesmo formato da versão automatizada (g/L ou mg/dL), usando a mesma faixa de referência do método de Clauss automatizado no mesmo centro.

Referências

Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) recommendations for processing of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(6): 1272-1283.

van den Besselaar A, van Rijn CJJ, Abdoel CF, Chantarangkul V, Scalabrino E, Kitchen S, Tripodi A, Woolley AM, Padovan L, Cobbaert CM. Paving the way for establishing a reference measurement system for standardization of plasma prothrombin time: Harmonizing the manual tilt tube method. *J Thromb Haemost* 2020; 18(8): 1986-1994.