
TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Teste de Tempo de Sangramento
 - ✓ Tempo de Protrombina (TP)
 - ✓ Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)
 - ✓ Testes de Mistura para Investigação Adicional de TP e TTPA Anormais
 - ✓ Tempo de Coagulação da Trombina
 - ✓ Tempo de Trombina na Presença de Sulfato de Protamina para Detectar a Presença de Heparina
 - ✓ Tempo de Reptilase
 - ✓ Fibrinogênio (Ensaio de Clauss Modificado)
 - ✓ Remoção de Heparina do Plasma
-

Teste de Tempo de Sangramento: o teste de tempo de sangramento foi historicamente desenvolvido para avaliar pré-operatoriamente a capacidade dos pacientes de manter um padrão de sangramento normal durante procedimentos cirúrgicos de grande porte ou em pacientes com suspeita de distúrbio hemorrágico causado por disfunção plaquetária. Infelizmente, foi confirmado que o teste é irreprodutível e insensível e, portanto, se necessário, deve ser utilizado em combinação com histórico familiar e clínico abrangente, acompanhado de testes de triagem de coagulação, incluindo contagem e morfologia plaquetária. O PFA 100/200 substituiu amplamente o teste de tempo de sangramento na avaliação da função plaquetária, apesar de suas inadequações observadas em pacientes trombocitopênicos (Rodgers and Levin, 2023; Undas, 2023).

O tempo de sangramento é o tempo necessário para que um corte na pele padronizado, de profundidade e comprimento fixos, pare de sangrar. Prolongamento do tempo de sangramento ocorre em pacientes com trombocitopenia, doença de von Willebrand (DWW) tipo 3 e tipo 2B, trombastenia de Glanzmann, síndrome de Bernard-Soulier, doença do pool de armazenamento, outros distúrbios plaquetários, sepse (Williams et al, 2024), doenças autoimunes, deficiência de vitaminas, anemia grave, malignidades hematológicas (por exemplo, distúrbios mieloproliferativos que resultam em deficiência de fator V) e reação a medicamentos (Vinholt et al, 2019). O fibrinogênio é necessário para interromper o sangramento, e foi sugerido um papel do FV. O tempo de sangramento pode, portanto, ser prolongado em pacientes com deficiência de fibrinogênio ou FV. Prolongamento do tempo de sangramento também ocorre em alguns pacientes com doença renal, disproteinemias e distúrbios vasculares (Russeau et al, 2023; Bourguignon et al, 2022).

Materiais e equipamentos:

- ✓ Esfigmomanômetro
- ✓ Swabs para assepsia
- ✓ Medidor de tempo de sangramento
- ✓ Papel filtro com 1 mm de espessura
- ✓ Cronômetro

Método:

- ✓ O manguito do esfigmomanômetro é colocado ao redor da parte superior do braço, posicionado na altura do coração, e inflado a 40 mm de mercúrio. Essa pressão é mantida durante todo o teste.
- ✓ A superfície dorsal do antebraço é limpa e o medidor de tempo de sangramento é colocado firmemente contra a pele, sem pressionar. O gatilho é pressionado e o cronômetro é acionado.
- ✓ Veias superficiais, cicatrizes e hematomas devem ser evitados.

- ✓ Em intervalos de 30 segundos, seque o fluxo de sangue com papel filtro. Aproxime o papel filtro das incisões, sem tocar a borda da ferida.
- ✓ Registre o tempo desde a punção até a interrupção do sangramento.

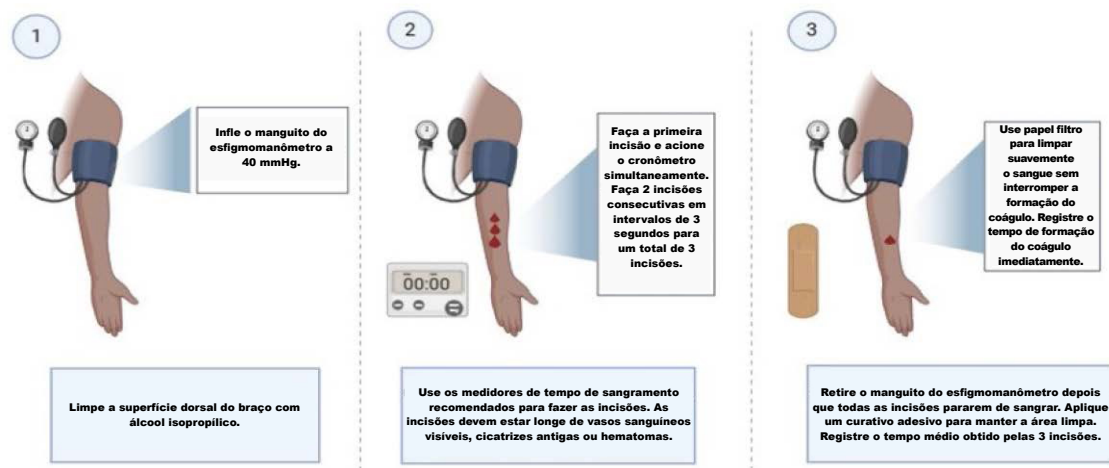


Figura 2. Diagrama de fluxo demonstrando o teste de tempo de sangramento. (Adaptado do modelo de Sally Kim de “Medição da pressão arterial: método auscultatório” em biorender.com.)

Interpretação: a faixa normal em adultos é de 2 a 7 minutos (até 8 minutos), mas pode variar de acordo com o método utilizado.

Observações: a faixa normal deve ser estabelecida localmente, independentemente do dispositivo utilizado. A incisão deve ser feita paralelamente ao comprimento do braço. Cortes feitos na perpendicular sangram por mais tempo. Um resultado anormal deve ser repetido. Não é necessário registrar os pontos finais se o sangramento continuar por mais de 20 minutos. O efeito de medicamentos que interferem na função plaquetária deve ser considerado. Por exemplo, medicamentos que contêm aspirina podem causar prolongamento. Portanto, sempre que possível, eles não devem ser tomados por sete dias antes do teste. Há a possibilidade de cicatrizes e, às vezes, formação de hematoma no local das incisões do teste de tempo de sangramento. Isso deve ser comunicado aos pacientes antes da realização da incisão. O tempo de sangramento em gestantes pode ser enganoso em razão dos níveis fisiologicamente elevados de FVIII e VWF. O manguito do esfigmomanômetro utilizado deve ser calibrado regularmente, de acordo com as diretrizes de padrões de qualidade em vigor. O método de Duke para tempo de sangramento apresenta maior taxa de inexatidão, com risco aumentado de desenvolvimento de hematoma (Russeau et al, 2023). Como o teste de tempo de sangramento é realizado à beira do leito, todos os procedimentos padrão relativos aos requisitos de qualidade de POCT devem ser aplicados para promover a segurança dos pacientes (ISO 15189:2022). Caso haja suspeita de DVW em um paciente e seu laboratório tenha capacidade para isso, os seguintes testes/ensaios devem ser realizados, juntamente com a obtenção de histórico abrangente de sangramento: antígeno FVW, atividade do FVW, ensaio de FVIII, hemograma completo (incluindo contagem e morfologia plaquetária) e testes básicos de triagem de coagulação (TP, TTPA, TT, fibrinogênio). Esses testes/ensaios permitiriam uma melhor compreensão do possível diagnóstico clínico na ausência do tempo de sangramento ou de um laboratório especializado em coagulação capaz de fazer o diagnóstico definitivo de DVW.

Tempo de Protrombina (TP): o TP avalia a integridade do sistema extrínseco. É muito útil na detecção de deficiências de fatores de coagulação, que podem ser qualitativas ou quantitativas, das vias extrínseca e comum. Também é útil para monitorar anticoagulantes antagonistas da vitamina K (VKA), como a varfarina, e detectar doenças hepáticas, deficiência de vitamina K, deficiência de FX causada por amiloidose, coagulação intravascular disseminada (CIVD), presença de anticoagulantes orais diretos (DOACs) de forma dose-dependente ou anticorpos contra fatores da via extrínseca. Essas condições podem prolongar os resultados do teste de TP (Dorgalaleh et al, 2021). O TP é sensível a alterações nos fatores V, VII e X, e menos ao FII (protrombina). É inadequado para detectar pequenas alterações no nível de fibrinogênio, pois os resultados podem ser anormais se o nível de fibrinogênio estiver muito baixo ou

se um inibidor estiver presente. A sensibilidade do teste é influenciada pelos reagentes e pela técnica utilizados, sendo importante estabelecer uma faixa de referência localmente. A via medida pelo TP é mostrada na Figura 3. O reagente de TP, frequentemente denominado tromboplastina, contém fator tecidual e fosfolipídios. Muitos reagentes adequados estão disponíveis comercialmente.

Reagentes:

- ✓ Tromboplastina (pode conter cloreto de cálcio)
- ✓ Cloreto de cálcio 25 mM (necessário apenas se o reagente tromboplastina não contiver cálcio)

Método: a técnica de inclinação manual do tubo é descrita na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas. Ao utilizar um novo reagente tromboplastina com número de lote diferente do anterior, uma nova curva de calibração deve ser traçada.

Interpretação: os tempos de coagulação normalmente são influenciados pelo uso de diferentes coagulômetros, dependendo de como e quando o ponto final é detectado. Isso enfatiza ainda mais a importância de estabelecer faixas normais para o método atualmente em uso no laboratório e com base na população local. Na presença de deficiências leves dos fatores II, V, VII ou X, o grau de prolongamento pode ser mínimo. No caso de deficiência de FII, o TP pode estar dentro da faixa normal. Alguns reagentes de TP podem ser afetados pela presença de anticoagulantes lúpicos/ anticorpos antifosfolipídios, e alguns tipos raros de anticorpos podem prolongar o TP sem nenhum prolongamento do TTPA. Reagentes com concentrações mais baixas de fosfolipídios têm maior probabilidade de serem afetados, inclusive alguns reagentes construídos pela lipidação do fator tecidual recombinante. A presença de FVII ativado, seja após terapia com FVIIa recombinante ou quando o FVII original foi ativado, pode encurtar o TP. O efeito depende do reagente de fator tecidual utilizado. Reagentes que contêm fator tecidual bovino são particularmente suscetíveis a esse efeito (Kitchen et al, 1992). O sangue total para determinação do TP pode permanecer estável por pelo menos 24 horas, dependendo do reagente usado (Baglin and Luddington, 1997). Os TPs determinados com reagentes contendo fator tecidual humano podem ser diferentes daqueles obtidos com reagentes contendo fator tecidual de outras espécies, como de coelho. Nesses casos, o resultado obtido com reagentes de fator tecidual humano pode ser mais indicativo de risco de sangramento. Para uma discussão completa sobre questões relacionadas à determinação do TP, leia as diretrizes vigentes do CLSI sobre TP e TTPA de um estágio (2023).

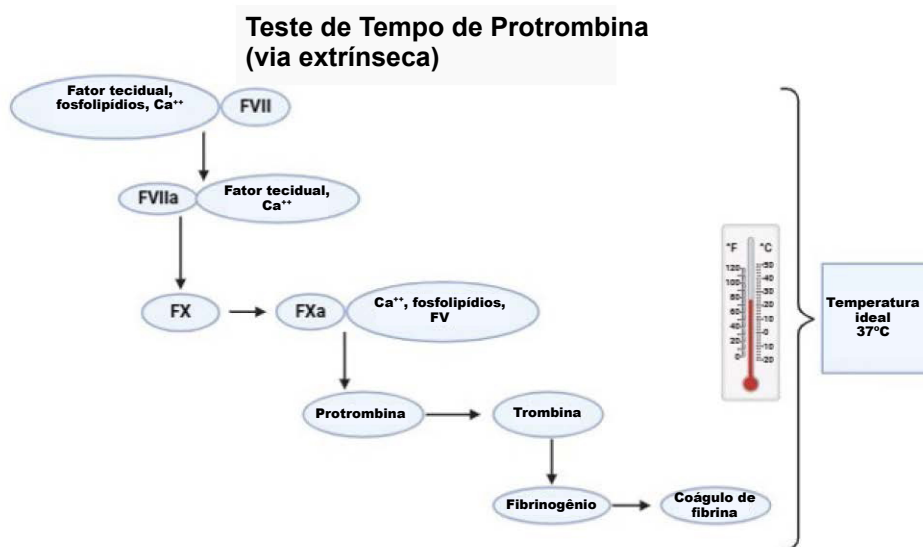


Figura 3. Via medida pelo teste de TP

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA): esse é um ensaio baseado na formação de coágulo que auxilia na identificação de deficiências de fatores de coagulação ou inibidores das vias intrínseca e comum. Em conjunto com o tempo de protrombina normal, é o teste de triagem mais útil para detectar deficiências dos fatores VIII, IX, XI e XII. O TTPA também será prolongado em qualquer deficiência que envolva as vias comuns (deficiências dos fatores V, X e II e fibrinogênio) e na presença de inibidores. A presença de alguns inibidores terapêuticos da coagulação, como a heparina, também prolongará o TTPA. É importante excluir a possibilidade de que esses tratamentos tenham sido utilizados na investigação inicial de TTPA prolongado. O TTPA é prolongado na presença de deficiência de PKK ou HMWK, a menos que o teste seja realizado com um reagente que contenha ácido elágico como ativador (Turi, 1986). Nesse caso, o TTPA será normal, mesmo na ausência completa desses fatores. É aconselhável observar que cada laboratório deve determinar suas faixas normais de TTPA com base na população local, no tipo de reagente de TTPA e no coagulômetro em uso. O reagente de TTPA contém fosfolipídios diluídos e ativadores de contato, como sílica, ácido elágico e caulim. Este é adicionado ao plasma citratado pobre em plaquetas a 37°C. Essa mistura é incubada a 37°C por um período específico para permitir a ativação dos fatores de contato. Em seguida, a adição de cloreto de cálcio leva à formação do coágulo de fibrina. O tempo necessário para a formação do coágulo é registrado em segundos. A via medida pelo TTPA é mostrada na Figura 4.

Reagentes:

- ✓ Reagente de TTPA
- ✓ Cloreto de cálcio 25 mM

Método: a técnica de inclinação manual do tubo é descrita na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas.

Interpretação: a faixa normal deve sempre ser estabelecida localmente. TTPA longo com TP normal indica uma possível deficiência dos fatores VIII, IX, XI, XII, HMWK, PKK ou a presença de um inibidor. Em casos de TTPA longo, uma mistura igual de plasma normal e de teste deve ser testada (ou seja, mistura de 1 parte de plasma de teste para 1 parte de plasma normal, chamada de mistura 50:50, abaixo). Se o TTPA corrigir em mais de 50% a diferença entre os tempos de coagulação do plasma normal e de teste, deficiência de fator é indicada (os detalhes são descritos no tópico específico a seguir). Correção inadequada sugere um inibidor, possivelmente de um dos fatores de coagulação no sistema ou do tipo não específico, como o anticoagulante lúpico.

Tabela 7. Exemplo de interpretação de TTPA prolongado

Amostra	Resultado
Controle de TTPA	35 segundos
Teste	60 segundos
Em caso de mistura 50:50	42 segundos (essa é uma boa correção, então provavelmente há deficiência de fator)
Em caso de mistura 50:50	52 segundos (essa é uma correção inadequada, então provavelmente há presença de um inibidor)

Investigação de TTPA prolongado isolado: para pacientes com TP normal e TTPA prolongado, a sequência normal de investigação a ser seguida é:

- ✓ Determinar o tempo de trombina. Se estiver normal, prosseguir com as etapas seguintes. Se o tempo de trombina estiver prolongado, repetir o teste na presença de sulfato de protamina. Se o tempo de trombina for corrigido para o normal, isso sugere a presença de heparina e os testes adicionais abaixo não são necessários. Se não houver conhecimento de que o paciente esteja recebendo heparina de qualquer tipo, deve-se solicitar uma amostra repetida.
- ✓ Determinar o TTPA em misturas de plasma normal e de paciente usando uma mistura 1:1 (50%) de normal:paciente. A falha da mistura de 50% em corrigir o TTPA para o normal pode indicar a presença de um inibidor (detalhes são descritos abaixo).

- ✓ Determinar o TTPA com um segundo reagente que contenha fosfolípidios em alta concentração, como o Actin FS (Dade Behring). Se o TTPA inicial estiver claramente prolongado (pelo menos três segundos acima do limite superior do normal em uso) e o Actin FS estiver normal, a causa provável é o anticoagulante lúpico. Isso pode ser confirmado posteriormente por testes específicos, como o tempo de veneno de víbora de Russell diluído, embora normalmente não seja necessário na ausência de qualquer necessidade de investigar a possibilidade de o anticoagulante lúpico ser um fator de risco para trombose. Muito raramente, deficiência de PKK é a outra causa possível de TTPA normal com Actin FS e prolongamento acentuado do TTPA com um reagente que utiliza sílica ou caulim como ativador. Como na maioria dos casos de anticoagulante lúpico, isso não está associado a nenhum risco de sangramento. Portanto, novamente, a confirmação pode não ser necessária. Quando o TTPA inicial estiver claramente prolongado (três ou mais segundos) e o TTPA com Actin FS estiver normal, não há necessidade de realizar ensaios de fatores.
- ✓ Se ambos os TTPAs estiverem prolongados, realizar os ensaios de FVIII:C, FIX e FXI. Um ensaio de FXII pode ser realizado, se necessário, visto que a deficiência é relativamente comum e sua detecção pode explicar o prolongamento do TTPA. Isso não é necessário para excluir a presença de um distúrbio hemorrágico, uma vez que a deficiência de FXII não está associada a risco aumentado de sangramento.
- ✓ Reagentes como Actin FS, que utilizam ácido elágico como ativador de contato, estão associados a resultados normais na presença de deficiência até mesmo grave de PKK.

Observações: muitos reagentes adequados estão disponíveis comercialmente. Estes incluem materiais com diferentes sensibilidades. Quanto ao TP, os tempos de coagulação podem ser influenciados pelo uso de coagulômetro. Historicamente, pesquisas comprovam que há muita variabilidade nos testes de TTPA, conforme observado na variação dos resultados de diferentes reagentes, variações dos resultados de diferentes coagulômetros e variação dos resultados de testes de amostras semelhantes em diferentes laboratórios. Essas evidências indicam a necessidade de aderir ao estabelecimento de faixas normais locais para coagulômetros e reagentes de TTPA específicos. Em plasmas de teste, altos níveis de um fator de coagulação podem compensar níveis mais baixos de outros fatores. Por exemplo, FVIII acentuadamente elevado durante uma reação de fase aguda pode ocasionar TTPA normal na presença de reduções de FIX ou FXI, o que pode ser clinicamente importante. Se um paciente tiver histórico pessoal ou familiar adequado sugestivo de distúrbio hemorrágico, investigações adicionais, incluindo ensaios de fatores específicos, podem ser justificadas na presença de TTPA normal, particularmente se o resultado estiver na parte superior da faixa de referência. A concentração de fosfolípidios varia muito entre os reagentes. Esse é um dos motivos pelos quais os reagentes variam demais na sensibilidade à presença de anticoagulantes lúpicos. Se um reagente sensível ao lúpus for usado para o TTPA inicial, é útil realizar um segundo teste de TTPA usando um reagente como Actin FS (Dade Behring, Marburg, Alemanha), que possui uma concentração muito alta de fosfolípidios (Kitchen et al, 1999). Se o prolongamento com o primeiro reagente for causado por anticoagulante lúpico, o segundo TTPA é quase sempre normal, visto que poucos anticoagulantes lúpicos prolongam o TTPA quando Actin FS é usado.

TTPA normal com Actin FS, combinado com TTPA inicial prolongado, normalmente exclui a presença de deficiência de FVIII, FIX ou FXI e, nesse caso, não há necessidade de ensaios de fatores. Raramente, TTPA normal com qualquer reagente pode ocorrer quando FIX ou FXI estiver levemente reduzido (30 a 50 U/dL) e FVIII estiver acentuadamente elevado. O TTPA com Actin FS é frequentemente normal quando FXII está reduzido na faixa de 20 a 50 U/dL e o TTPA com ativação à base de caulim ou sílica está levemente elevado. Esse defeito não tem relevância clínica. Alguns anticoagulantes lúpicos potentes prolongam o TTPA com Actin FS. Anticorpos específicos contra FVIII, FIX ou FXI prolongam o TTPA, independentemente do reagente. Para uma discussão completa sobre questões relacionadas à determinação do TTPA, consulte CLSI (2023).

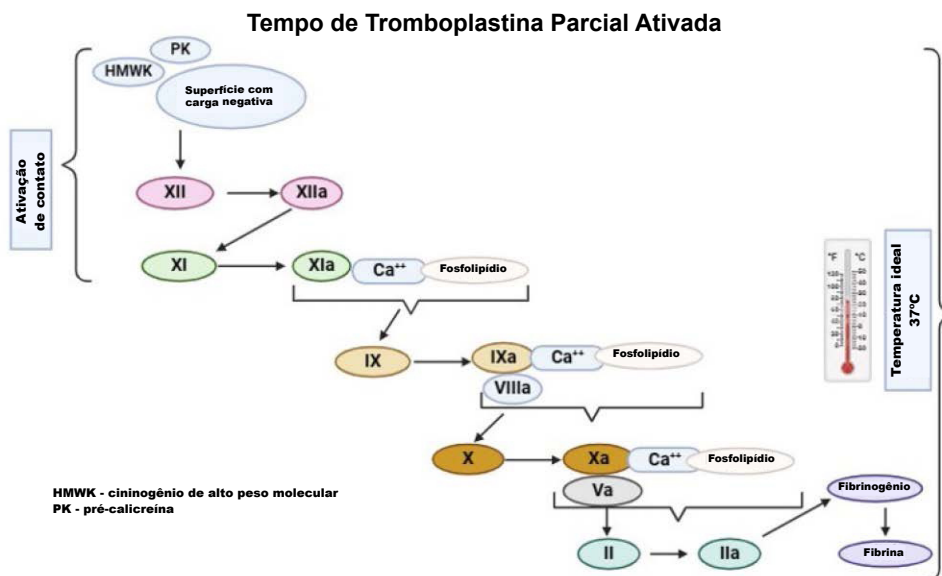


Figura 4. Via medida pelo TTPA

Testes de Mistura para Investigação Adicional de TP e TTPA Anormais: testes de mistura são amplamente realizados quando o TP ou TTPA basal está prolongado e a causa do prolongamento precisa ser identificada para que testes adicionais possam ser realizados a fim de chegar a um diagnóstico. Muita variabilidade tem sido identificada na forma como os testes de mistura são realizados e interpretados. O conhecimento sobre deficiências de fatores e comportamento de inibidores em estudos de mistura é fundamental, além dos fatores que podem influenciar o desempenho e a interpretação dos testes de mistura (Figura 5) (Favaloro, 2020; Adcock et al, 2023). Plasma do paciente e PNP são misturados em partes iguais (ou seja, 50:50) e o teste previamente prolongado é realizado nessa mistura. Os controles apropriados (PNP misturado com plasma contendo inibidor e PNP misturado com plasma contendo deficiência de fator) devem ser utilizados. Existem vários métodos de interpretação e cada laboratório deve estabelecer suas próprias faixas de corte. Cada laboratório também deve estabelecer os intervalos de referência normais para TP e TTPA com base na população local para orientar a interpretação exata dos resultados (Adcock et al, 2023).

Procedimento:

- ✓ Misture partes iguais de PNP e plasma do paciente (50:50) e prepare para o teste previamente prolongado (TTPA será aplicado nesse caso).

Se o resultado do TTPA obtido a partir da mistura de plasma de controle normal e do paciente for corrigido em comparação com o resultado do TTPA prolongado original, testes de mistura adicionais podem ser realizados para identificar o fator deficiente no paciente. Um segundo lote de testes de mistura pode ser realizado com o uso de um tubo contendo uma mistura de plasma do paciente e plasma deficiente em FVIII em partes iguais, e um segundo tubo contendo uma mistura igual de plasma deficiente em FIX com plasma do paciente. O teste de TTPA é realizado em ambas as misturas. O resultado do TTPA que apresentar correção indica deficiência de FVIII ou FIX (Tabela 8).

Essas duas misturas são realizadas somente se o histórico clínico do paciente for sugestivo de deficiência de fatores da via intrínseca em laboratórios que não têm capacidade para realizar ensaios de fatores.

Interpretação dos testes de mistura: se o TTPA corrigir em mais de 50% a diferença entre os tempos de coagulação do plasma normal e de teste, deficiência de fator é indicada, como já discutido. Correção inadequada sugere um inibidor, possivelmente de um dos fatores de coagulação no sistema ou do tipo não específico, como o

anticoagulante lúpico. Também podemos usar o cálculo da porcentagem (%) de correção para interpretação do teste de mistura, como mostrado abaixo.

$$(\%) \text{ Correção} = \frac{(\text{TTPA do paciente} - \text{TTPA da mistura})}{(\text{TTPA do paciente} - \text{TTPA do NPP})} \times 100$$

Correção = % do valor está acima/é igual ao ponto de corte estabelecido localmente

Sem correção = % do valor está abaixo do ponto de corte estabelecido localmente

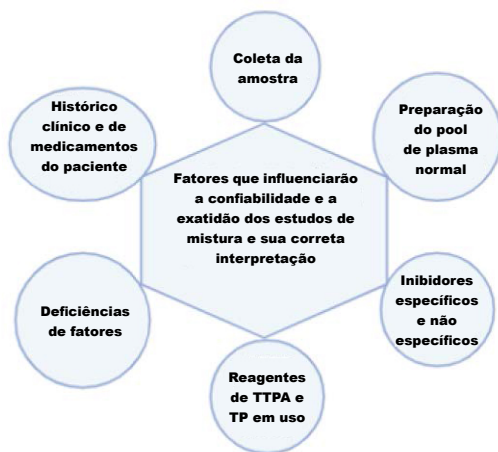


Figura 5. Diagrama desenvolvido em biorender.com usando informações obtidas de Adcock et al.

Conforme destacado em Adcock et al (2023), existem vários fatores que influenciam a exatidão dos testes de mistura. Um fator importante é conhecer o histórico clínico e de medicamentos do paciente. Outros fatores importantes incluem se a coleta da amostra foi realizada de acordo com os padrões aceitos, se o paciente tem histórico prévio de deficiência de fator, o tipo de reagentes usados e sua sensibilidade (especialmente a deficiências leves de fatores e inibidores), o estabelecimento de intervalos de referência normais para testes de triagem usando amostras normais da população local, a preparação do pool de plasma normal e os níveis de concentração de fatores de coagulação (pelo menos 80%) e se os inibidores específicos ou não específicos são de natureza endógena ou exógena. A melhor compreensão desses fatores aumentará a capacidade dos laboratórios de interpretar corretamente os resultados dos testes de mistura.

Plasma deficiente em FVIII/FIX para estudo de mistura: plasma de pacientes com deficiência grave isolada (<1 UI/dL) de FVIII ou FIX é muito útil para estudos de mistura. O plasma selecionado para esse propósito deve ter TP normal, confirmando que os outros fatores de coagulação sintetizados no fígado provavelmente estão em níveis normais. Esses plasmas podem ser liofilizados para armazenamento de longo prazo ou armazenados como plasma a -35°C (ou menos) por pelo menos três meses. Utilizando misturas 50:50 de aditivo e plasma do paciente, uma anormalidade pode ser caracterizada. Nas situações em que há prolongamento isolado do TTPA, plasma deficiente em FVIII é preferível ao plasma envelhecido. Da mesma forma, plasma deficiente em FIX é preferível ao plasma adsorvido.

É ético obter o consentimento livre e esclarecido do paciente antes de coletar uma amostra para uso em testes de mistura. O status de inibidor negativo deve ser estabelecido antes da coleta de amostras para testes de mistura.

Tabela 8. Padrão de resultados de testes de mistura na presença de deficiências de fatores individuais

Defeito no plasma de teste	TTPA	Deficiente em FVIII	Deficiente em FIX	Plasma normal
FVIII	anor	sem corr	corr	corr
FIX	anor	corr	sem corr	corr
FXI/FXII	anor	corr	corr	corr
Inibidor	anor	sem corr	sem corr	sem corr

Defeito no plasma de teste	TP	TTPA	Plasma normal
FII	anor	anor	corr
FV	anor	anor	corr
FVII	anor	norm	corr
FX	anor	anor	corr

anor = anormal; sem corr = sem correção; corr = correção

Observações: a amostra para coagulação deve conter contagem de plaquetas $<10 \times 10^9/L$ para proporcionar um teor mínimo de fosfolípidios e permitir a detecção de anticoagulantes lúpicos fracos (Toulon et al, 2016). Os estudos de mistura devem ser realizados apenas no mesmo plasma que forneceu um resultado prolongado. Se, por algum motivo, uma nova amostra for coletada do paciente, o teste basal anormal deve ser repetido antes da realização do teste de mistura. Validação e verificação de novos reagentes com novos números de lote devem ser sempre realizadas para garantir que a sensibilidade do reagente a inibidores e deficiências de fatores ainda esteja na faixa aceitável (Toulon et al, 2016). Todas as amostras para coagulação devem ser coletadas conforme descrito na Parte 3 deste manual. Inibidores não específicos que afetam o TTPA (por exemplo, anticoagulante lúpico) geralmente não mostram correção, embora plasmas contendo inibidores mais fracos ou de baixo título possam ser parcialmente corrigidos por plasma normal.

Inibidores específicos contra o FVIII: inibidores específicos contra o FVIII podem estar associados à ausência de correção imediata do TTPA após a adição de plasma normal. Em outros casos, há uma correção imediata por plasma normal, seguida de prolongamento do TTPA na mistura ao longo do tempo. Uma mistura de plasma de teste e normal deve ser testada após uma hora a 37°C, juntamente com determinações do TTPA em plasmas normal e de teste que foram incubados separadamente ao mesmo tempo. Inibidores específicos contra outros fatores de coagulação são particularmente raros, mas podem ocorrer. Não é possível generalizar seu comportamento em experimentos de mistura, exceto que os inibidores de FIX são tipicamente de ação rápida. A Figura 6 mostra como o TTPA muda quando 20% e 50% de PNP são adicionados a amostras de indivíduos com hemofilia A adquirida com anticorpos anti-FVIII. O limite superior da faixa normal para este método de TTPA foi de 37 segundos. Esse exemplo ilustra que, na presença de anticorpos anti-FVIII, pode haver correção total em uma mistura 50:50 de plasma de paciente e PNP em alguns casos. Se essas misturas forem incubadas a 37°C, há um aumento progressivo no TTPA, pois os anticorpos anti-FVIII inibem o FVIII. O ensaio de Nijmegen Bethesda é o teste “padrão ouro” na quantificação de inibidores presentes em uma amostra de plasma após triagem positiva. O ensaio cromogênico de Bethesda é o teste de escolha para avaliar inibidores em pacientes em uso de emicizumabe, pois os resultados da triagem de inibidores com base no TTPA são sabidamente menores em pacientes em uso de emicizumabe (Lowe et al, 2020). Inibidores de outros fatores de coagulação, como os inibidores de FXa, podem ser detectados por meio de ensaio de atividade anti-FXa.

Tabela 9. Estudos de mistura em hemofilia A adquirida

Título de Bethesda (U/mL)	TTPA (segundos)	TTPA + 20% de plasma normal (segundos)	TTPA + 50% de plasma normal (segundos)
1,0	210	137	77
1,1	83	52	38
2,0	82	43	34
6,6	107	51	37
8,4	150	55	39
21	145	62	48
23	123	127	55
120	69	50	38

Tempo de Coagulação da Trombina: o tempo de coagulação da trombina (também conhecido como tempo de trombina) é útil na identificação de anormalidades hereditárias de fibrinogênio, bem como anormalidades quantitativas ou qualitativas adquiridas. Sabe-se que o tempo de trombina é muito sensível à presença de heparina ou de medicamentos como inibidores diretos da trombina (DTIs) (Bonar et al, 2017). O tempo de trombina reflete a reação entre a trombina e o fibrinogênio. Ele é prolongado quando o nível de fibrinogênio é muito baixo (menos de 1,0 g/L); na presença de heparina, substâncias semelhantes à heparina, DTIs ou outros inibidores (por exemplo, produtos de degradação de fibrina/fibrinogênio [FDPs]); e quando o fibrinogênio é qualitativamente anormal (disfibrinogenemia), incluindo defeitos congênitos e adquiridos secundários a doença hepática (Mackie et al, 2024).

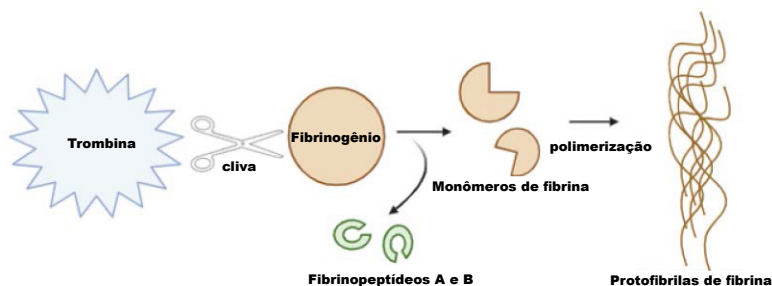


Figura 6. Diagrama de fluxo representando a conversão de fibrinogênio em fibrina na presença de trombina. Desenvolvido com o uso de Biorender.

Reagentes:

- ✓ Solução de trombina, que induz a coagulação do plasma normal em cerca de 15 segundos.
- ✓ Soluções mais fortes proporcionam tempos de coagulação mais curtos e podem ser normais na presença de defeitos leves.

Existem diversos reagentes de trombina disponíveis comercialmente. Alguns possuem dois níveis de diluição de reagente de trombina com o tampão para triagem, e uma terceira concentração de reagente de trombina para amostras com alto teor de heparina, sugestivo de paciente em uso de heparina terapêutica. Como de costume, recomenda-se seguir as instruções do fabricante, e faixas de referência normais locais devem ser estabelecidas pelo laboratório.

Método: o método de inclinação manual do tubo é descrito na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas.

Observações: a concentração de trombina utilizada deve ser aquela que proporcione um tempo de coagulação de aproximadamente 15 segundos com PNP (controle). Se for utilizada trombina concentrada, ela deve ser diluída para

cerca de 10 a 15 U/mL em solução salina e posteriormente diluída conforme necessário, até que o tempo de controle apropriado seja obtido. Para todos os reagentes de trombina adquiridos comercialmente, as instruções do fabricante sobre reconstituição, uso e armazenamento devem ser seguidas. A trombina reconstituída pode ser armazenada a -35°C ou menos e diluída antes do uso. A trombina diluída mantida em temperatura ambiente se deteriorará. Controle de PNP deve ser incluído em cada grupo de testes. Amostras de plasma para tempo de trombina devem ser testadas em até 4 horas após a coleta e em até 2 horas se houver suspeita da presença de heparina. Altos níveis de heparina na amostra de um paciente sendo testada para tempo de trombina causarão ausência da formação de coágulo. Isso também é possível com alguns DTIs, como a dabigatrana. Use o teste de tempo de reptilase para confirmar a presença de DTIs ou contaminação/presença de heparina na amostra do paciente. Houve variação nos resultados dos métodos de tempo de trombina com base no tipo de reagente e no instrumento de coagulação utilizado; portanto, recomenda-se que o resultado de cada paciente seja relatado junto com a faixa de referência específica para aquele reagente e instrumento.

Tempo de Trombina na Presença de Sulfato de Protamina para Detectar a Presença de Heparina: a presença de HNF pode causar prolongamento do tempo de trombina. As formas maiores de heparina, que prolongam o tempo de trombina, podem ser neutralizadas pela adição de sulfato de protamina. Sulfato de protamina está disponível em muitas farmácias hospitalares, onde é usado como agente terapêutico para reverter o efeito da heparina. A concentração do medicamento em preparações terapêuticas é normalmente muito maior do que a utilizada para fins de testes laboratoriais. Portanto, se necessário, o medicamento deve ser diluído em solução salina até uma concentração de 40 mg% como solução de trabalho. A solução de trabalho de trombina com sulfato de protamina é preparada misturando nove partes de reagente de trombina com uma parte de 40 mg% de sulfato de protamina. Esta é então usada no lugar da solução de trombina. O controle normal deve ser analisado. Se o tempo de trombina for prolongado, mas corrigido para dentro de dois segundos do resultado do controle, a presença de heparina é confirmada.

Reagentes (Hogwood et al. 2017):

- ✓ Tampão barbitona pH 7,4 (Fritsma, 2019)
- ✓ Estoque de sulfato de protamina – use 5 mL de sulfato de protamina 10 mg/mL para fazer uma diluição de 1/20 usando tampão barbitona. Diluições seriadas de várias concentrações de sulfato de protamina podem ser preparadas a partir desta solução. Elas permanecem estáveis quando armazenadas a 4°C.
- ✓ PPP do paciente
- ✓ Trombina

Método:

- ✓ Dilua em série o sulfato de protamina em tampão barbitona.
- ✓ Prepare a trombina diluída utilizando tampão barbitona. A adição de 100 µL de trombina diluída a 200 µL de plasma do paciente em tampão a 37°C deve permitir a formação de coágulo em 10 segundos.

Interpretação: se o coágulo se formar em até 10 segundos, HNF não está presente no plasma do paciente. Se o tempo for prolongado, HNF está presente no plasma do paciente. O plasma do paciente é misturado com sulfato de protamina diluído e o teste é repetido. O objetivo é medir o tempo de trombina em diferentes diluições de plasma do paciente e sulfato de protamina que permitem a formação de coágulo dentro da faixa normal.

Tempo de Reptilase: reptilase é um veneno de cobra obtido de *Bothrops atrox*. É uma enzima semelhante à trombina, denominada batroxobina, que atua clivando o fibrinogênio para formar fibrinopeptídeo A, levando à formação de um monômero de fibrina e à formação de coágulo por polimerização. Não é inibida por antitrombina, de modo que não é afetada pela presença de heparina ou DTIs. Portanto, pode ser usada para avaliar a taxa de conversão de fibrinogênio em fibrina na presença de heparina e DTIs (Mackie et al, 2024). É útil verificar se o tempo de trombina prolongado é causado pela presença de heparina ou DTIs na amostra. Se o tempo de trombina estiver prolongado e a reptilase estiver normal, a causa mais provável é a presença de heparina ou de um DTI. Na presença de disfibrinogemia, o tempo de reptilase pode ser mais sensível (ou seja, mais prolongado) do que o tempo de trombina. A reptilase adicionada ao plasma do paciente (PPP) fornece batroxobina, que cliva o fibrinogênio, liberando fibrinopeptídeo A para formar um monômero de fibrina com formação de coágulo após a polimerização (Karapetian, 2013).

Reagentes: reptilase (Sigma Aldrich, código V5375) dissolvida na concentração de 25 mg em 15 mL de tampão de Owren. Esse veneno bruto é perigoso e deve-se tomar cuidado para evitar a inalação do pó. O operador deve usar luvas e máscara ao manusear o veneno bruto. A solução estoque deve ser armazenada congelada a -70°C em alíquotas de 0,5 mL. Permanece estável por pelo menos dois anos nessas condições. Para preparar o reagente pronto para uso, descongele e dilua o reagente estoque a 1/10 em tampão de Owren, divida em alíquotas e congele novamente a -70°C para uso posterior. Esse reagente pronto para uso permanece estável nessas condições por pelo menos três meses. Alíquotas congeladas prontas para uso devem ser descongeladas em banho-maria a 37°C por no mínimo três minutos. Depois disso, essas alíquotas permanecem estáveis para uso por pelo menos 12 horas em temperatura ambiente de 20 a 25°C. Existem diversas preparações de batroxobina disponíveis comercialmente.

Método:

- ✓ Realize todos os testes em duplicata.
- ✓ Coloque tubos de coagulação de vidro de 75 x 10 mm suficientes em banho-maria a 37°C (dois por paciente, mais dois para o controle).
- ✓ Pipete 0,3 mL de plasma (de controle ou paciente) em tubos de coagulação para aquecimento.
- ✓ Aqueça por um a dois minutos.
- ✓ Adicione 0,1 mL de diluição de reptilase e acione o cronômetro.
- ✓ Incline três vezes para misturar e, em seguida, três vezes a cada cinco segundos até a formação do coágulo.
- ✓ Registre o tempo de coagulação.
- ✓ O tempo de controle deve ser de 15 a 18 segundos. (Se for menor, ajuste diluindo mais o reagente de reptilase com tampão de Owren.)
- ✓ Se não ocorrer coagulação, relate como >90 segundos.

Faixa normal: o tempo do paciente deve estar dentro de três segundos do tempo de controle. O tempo de controle deve ser relatado juntamente com o tempo do paciente.

Interpretação: a interpretação do tempo de trombina prolongado e do tempo de reptilase é apresentada na Tabela 10.

Tabela 10. Interpretação do tempo de trombina prolongado

Tempo de trombina	Tempo de reptilase	Causa	Observações
Prolongado	Igualmente prolongado	Hipo ou afibrinogenemia	Medir fibrinogênio
Prolongado	Fortemente prolongado	Disfibrinogenemia	Congênita ou adquirida
Prolongado	Normal	Heparina	
Prolongado	Discretamente prolongado	Heparina com alguma hipo ou disfibrinogenemia	Caso raro de disfibrinogenemia pode gerar este padrão
Prolongado	Igualmente prolongado	Coagulação intravascular disseminada (CIVD)	Medir dímeros D
Prolongado	Normal	Inibidores diretos da trombina	

Observação: reagentes de reptilase estão disponíveis em concentração pronta para uso de diversos fabricantes comerciais. A vantagem disso é que não há necessidade de manipular o veneno bruto, evitando assim problemas de saúde e segurança. Caso use um desses, siga as instruções de uso do fabricante. Quando a reptilase for um reagente caro, o método de neutralização com protamina/tempo de trombina pode ser usado para confirmar a presença de heparina na amostra de teste.

Fibrinogênio (Ensaio de Clauss Modificado): diluições de plasma normal padrão com teor conhecido de fibrinogênio são preparadas em tampão glioxalina. O tempo de coagulação é medido após a adição de trombina e um gráfico é construído. O tempo de coagulação é proporcional à concentração de fibrinogênio, e

a diluição de 1/10 representa o valor na preparação padrão. O plasma de teste é diluído 1/10 e o resultado é lido na linha padrão.

Reagentes:

- ✓ Plasma padrão ou de referência com concentração conhecida de fibrinogênio
- ✓ Trombina em alta concentração de 100 – 200 U/mL (a concentração pode variar de acordo com a fonte).
- ✓ Tampão imidazol (glioxalina) ou tampão de Owren pH 7,35

Método: a técnica de inclinação manual do tubo é descrita na Parte 4 deste manual. As recomendações do fabricante do reagente devem ser seguidas.

Esse teste não é afetado pela heparina nos níveis utilizados para o tratamento de tromboembolismo venoso. Supõe-se que o uso de uma concentração mais alta de trombina anule o efeito de altas concentrações de HNF sobre a trombina, como as aplicadas na circulação extracorpórea, permitindo a formação de coágulo. No entanto, deve-se ter cautela ao interpretar os resultados desses pacientes, uma vez que podem ser observados tempos de coagulação prolongados, levando a subestimação do fibrinogênio, a menos que o reagente contenha neutralizadores de heparina para anular isso. O efeito dos DTIs dependerá altamente da concentração do DTI no plasma do paciente e do tipo de reagente utilizado. Os DTIs na faixa terapêutica não afetam a trombina em alta concentração usada no ensaio de fibrinogênio de Clauss (Mackie et al, 2024).

Dados de calibração típicos:

(Observação: uma curva de calibração deve ser estabelecida com os reagentes em uso local.)

Plasma padrão: 2,1 g/L de fibrinogênio

Tabela 11. Exemplo de calibração de fibrinogênio

Diluição do padrão	Concentração de fibrinogênio (g/L)	Tempo de coagulação (segundos)
1/5	4,2	8,5
1/10	2,1	14
1/15	1,4	19,5
1/20	1,05	24,5

Exemplos:

Plasma de teste 1: diluído 1:10, tempo de coagulação de 15 segundos.

fibrinogênio = 1,9 g/L (do gráfico de calibração)

Plasma de teste 2: diluído 1:5, tempo de coagulação de 16 segundos.

fibrinogênio = 1,8 g/L do gráfico de calibração x 5/10 (desde a diluição de 1/5 em vez de 1/10)

= 0,9 g/L

Observações sobre o ensaio de fibrinogênio de Clauss: o nível de fibrinogênio pode ser subestimado na presença de altas concentrações de produtos de degradação de fibrina/fibrinogênio; portanto, recomenda-se interpretação cuidadosa dos resultados quando houver suspeita disso. A coleta de amostras de sangue para coagulação de dispositivos venosos ou arteriais contaminados com heparina deve ser evitada para excluir a possibilidade de interferência obscura da heparina nos resultados obtidos. Amostras de pacientes que recebem altas doses de HNF devem ser evitadas ao quantificar os níveis de fibrinogênio para evitar a obtenção de resultados falsamente baixos.

Teste de Fibrinogênio Derivado de TP: diversos analisadores de coagulação podem estimar o nível de fibrinogênio durante a determinação do tempo de protrombina. Isso é possível porque a alteração na dispersão ou transmissão da luz causada pela formação do coágulo é proporcional à concentração inicial de fibrinogênio. Esses métodos são comumente chamados de fibrinogênio derivado de TP. A maioria dos métodos derivados de TP apresenta limitações. Em particular, os resultados obtidos são frequentemente muito mais altos do que os obtidos pelo ensaio de Clauss quando há níveis muito baixos (<1,5 g/L) ou elevados (acima de 5 g/L) de fibrinogênio. Os resultados geralmente ficam acima do normal na presença de disfibrinogenemia (Mackie et al, 2024; Miesbach et al, 2010). Existem métodos de fibrinogênio de Clauss adequados para análise de plasma de teste não diluído, mas os resultados podem não ser intercambiáveis com os resultados dos ensaios de Clauss amplamente utilizados que empregam plasma de teste diluído (Jennings et al, 2009).

Fatores que afetam o uso de fibrinogênio derivado de TP: para pacientes em terapia anticoagulante, é aconselhável não utilizar a estimativa de fibrinogênio derivado de TP para quantificar seus níveis de fibrinogênio. Certos anticoagulantes orais afetam a geração de trombina, acabando por reduzir a produção de trombina e causando a formação de fibrilas espessas que são detectadas como turbidez na amostra pelos sensores ópticos e retransmitidas como aumento de fibrinogênio (Chitolie et al, 1994). Houve casos de pacientes com hipodisfibrinogenemia que foram identificados como tendo fibrinogênio derivado de TP normal, enquanto esses níveis eram, na verdade, baixos quando medidos pelo método de Clauss (Chitolie et al, 1994). A turbidez do plasma de referência ocasiona estimativas mais altas dos níveis de fibrinogênio. Além disso, o plasma lipêmico e turvo de paciente pode levar a estimativas errôneas e elevadas de fibrinogênio. Esses níveis inexatos de fibrinogênio podem ser observados em pacientes com doenças crônicas e graves. Com base nas diretrizes internacionais vigentes sobre quantificação de fibrinogênio, recomenda-se o método de fibrinogênio de Clauss e, em razão das inexatidões associadas ao fibrinogênio derivado de TP, não deve ser usado para triagem de deficiências de fibrinogênio nem em pacientes sabidamente em terapia anticoagulante, e os resultados devem ser interpretados com cautela.

Remoção de Heparina do Plasma: a heparinase 1 (componente ativo do Hepzyme®) é específica para a heparina, que cliva em múltiplos sítios por molécula, produzindo oligossacarídeos que perderam sua atividade antitrombótica. Hepzyme® é uma heparinase 1 bacteriana purificada, produzida por *Flavobacterium heparinum*. Consegue remover até 2 UI de heparina por mL de plasma. Hepzyme® pode ser usado para neutralizar o efeito da heparina em uma amostra, permitindo a avaliação do status de coagulação subjacente. É particularmente utilizado em casos de contaminação por heparina (Forte e Abshire, 2000).

Reagentes:

- ✓ Hepzyme®, frasco contendo preparação seca de heparinase 1 com estabilizantes
- ✓ Fabricante: Dade Behring
- ✓ Armazenamento: 4°C
- ✓ Estabilidade: de acordo com a data de validade do fabricante. Cada frasco é usado apenas para teste de um paciente

Método:

- ✓ Adicione 1,0 mL de plasma citratado pobre em plaquetas a um frasco de Hepzyme®.
- ✓ Feche novamente e inverta suavemente de 5 a 10 vezes.
- ✓ Deixe em temperatura ambiente por 15 minutos.
- ✓ Transfira para um copo de amostra de plástico de 2 mL e aguarde alguns instantes para que as bolhas desapareçam.
- ✓ Coloque no CA1500 e realize o teste necessário.

O tempo de trombina deve ser incluído para verificar se toda a heparina foi removida com sucesso. Os testes devem ser realizados o mais breve possível (ou seja, dentro das diretrizes de teste para esse procedimento).

Interpretação: essa enzima não remove nenhum fator de coagulação (ao contrário de algumas das técnicas alternativas para remoção de heparina), portanto, uma redução substancial dos tempos de coagulação no TTPA, tempo de trombina ou TP após o tratamento com hepzyme indica a presença de heparina. As formas de HNF e de baixo peso molecular são degradadas por essa enzima.

Referências

- Adcock DM, Gosselin RC. The danger of relying on the APTT and PT in patients on DOAC therapy, a potential patient safety issue. *Int J Lab Hematol* 2017; 39 Suppl 1: 37-40.
- Adcock DM, Moore GW, Montalvão SL, Kershaw G, Gosselin RC. Activated partial thromboplastin time and prothrombin time mixing studies: Current state of the art. *Semin Thromb Hemost* 2023; 49(6): 571-579.
- Baglin T, Luddington R. Reliability of delayed INR determination: Implications for decentralized anticoagulant care with off-site blood sampling. *Br J Haematol* 1997; 96(3): 431-434.
- Bonar RA, Lippi G, Favaloro EJ. Overview of Hemostasis and Thrombosis and Contribution of Laboratory Testing to Diagnosis and Management of Hemostasis and Thrombosis Disorders. In: Favaloro EJ, Lippi G, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer New York; 2017: 3-27.
- Bourguignon A, Tasneem S, Hayward CP. Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2022; 59(6): 405-444.
- Chitolie A, Mackie IJ, Grant D, Hamilton JL, Machin SM. Inaccuracy of the 'derived' fibrinogen measurement. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994; 5(6): 955-957.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. One-stage prothrombin time (PT) test and activated partial thromboplastin time (APTT) test, 3rd edition. CLSI standard H47. 2023. <https://clsi.org/standards/products/hematology/documents/h47>.
- Dorgalaleh A, Favaloro EJ, Bahraini M, Rad F. Standardization of prothrombin time/international normalized ratio (PT/INR). *Int J Lab Hematol* 2021; 43(1): 21-28.
- Favaloro EJ. Coagulation mixing studies: Utility, algorithmic strategies and limitations for lupus anticoagulant testing or follow up of abnormal coagulation tests. *Am J Hematol* 2020; 95(1): 117-128.
- Favaloro EJ. Optimizing the verification of mean normal prothrombin time (MNPT) and international sensitivity index (ISI) for accurate conversion of prothrombin time (PT) to international normalized ratio (INR). *Methods Mol Biol* 2017; 1646: 59-74.
- Forte K, Abshire T. The use of heparinase in removing heparin from blood samples drawn from central venous access devices. *J Pediatr Oncol Nurs* 2000; 17(3): 179-181.
- Fritsma GA. Antithrombotic Therapies and Their Laboratory Assessment. In: *Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications*. 2019: 746-764.
- Hogwood J, Mulloy B, Gray E. Precipitation and neutralization of heparin from different sources by protamine sulfate. *Pharmaceuticals (Basel)* 2017; 10(3): 59.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 15189:2022(en) Medical laboratories — Requirements for quality and competence. <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:15189:ed-4:v1:en>. Accessed March 23, 2025.
- Jennings I, Kitchen DP, Woods T, Kitchen S, Walker ID. Differences between multifibrin U and conventional Clauss fibrinogen assays: Data from UK National External Quality Assessment Scheme surveys. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2009; 20(5): 388-390.
- Karapetian H. Reptilase time (RT). *Methods Mol Biol* 2013; 992: 273-277.
- Kitchen S, Adcock DM, Dauer R, Kristoffersen AH, Lippi G, Mackie I, Marlar RA, Nair S. International Council for Standardisation in Haematology (ICSH) recommendations for collection of blood samples for coagulation testing. *Int J Lab Hematol* 2021; 43(4): 571-580.
- Kitchen S, Cartwright I, Woods TA, Jennings I, Preston FE. Lipid composition of seven APTT reagents in relation to heparin sensitivity. *Br J Haematol* 1999; 106(3): 801-808.
- Kitchen S, Malia RG, Preston FE. A comparison of methods for the measurement of activated factor VII. *Thromb Haemost* 1992; 68(3): 301-305.
- Lowe A, Kitchen S, Jennings I, Kitchen DP, Woods TAL, Walker ID. Effects of emicizumab on APTT, FVIII assays and FVIII inhibitor assays using different reagents: Results of a UK NEQAS proficiency testing exercise. *Haemophilia* 2020; 26(6): 1087-1091.

Mackie I, Casini A, Pieters M, Pruthi R, Reilly-Stitt C, Suzuki A. International Council for Standardisation in Haematology recommendations on fibrinogen assays, thrombin clotting time and related tests in the investigation of bleeding disorders. *Int J Lab Hematol* 2024; 46(1): 20-32.

Mackie IJ, Kitchen S, Machin SJ, Lowe GD. Guidelines on fibrinogen assays. *Br J Haematol* 2003; 121(3): 396-404.

Maier CL, Sniecinski RM. Anticoagulation monitoring for perioperative physicians. *Anesthesiology* 2021; 135(4): 738-748.

Mielke CH. Measurement of the bleeding time. *Thromb Haemost* 1984; 52(2): 210-211.

Miesbach W, Schenk J, Alesci S, Lindhoff-Last E. Comparison of the fibrinogen Clauss assay and the fibrinogen PT derived method in patients with dysfibrinogenemia. *Thromb Res* 2010; 126(6): e428-433.

Miller CH. Laboratory testing for factor VIII and IX inhibitors in haemophilia: A review. *Haemophilia* 2018; 24(2): 186-197.

Pipe SW. Functional roles of the factor VIII b domain. *Haemophilia* 2009; 15(6): 1187-1196.

Practical-Haemostasis.com. Protamine sulphate neutralization test. <https://practical-haemostasis.com/>. Accessed March 23, 2025.

Rodgers RPC, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 499-516.

Russeau AP, Vall H, Manna B. Bleeding Time. [Updated 2023 Aug 8]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/books/NBK537233/>. Accessed March 23, 2025.

Toulon P, Eloit Y, Smahi M, Sigaud C, Jambou D, Fischer F, Appert-Flory A. In vitro sensitivity of different activated partial thromboplastin time reagents to mild clotting factor deficiencies. *Int J Lab Hematol* 2016; 38(4): 389-396.

Undas A. The bleeding time test in 2024: A glorious past and current challenges. *Semin Thromb Hemost* 2024; 50(3): 517-519.

Vandiver JW, Vondracek TG. Antifactor Xa levels versus activated partial thromboplastin time for monitoring unfractionated heparin. *Pharmacotherapy* 2012; 32(6): 546-558.

Vinholt PJ. The role of platelets in bleeding in patients with thrombocytopenia and hematological disease. *Clin Chem Lab Med* 2019; 57(12): 1808-1817.

Williams B, Lin Z, Pittet JF, Chao W. Sepsis-induced coagulopathy: a comprehensive narrative review of pathophysiology, clinical presentation, diagnosis, and management strategies. *Anesth Analg* 2024; 138(4): 696-711.