

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE FIBRINOGÊNIO DOSADO BCT ANALYSER (DADE BEHRING) E DERIVADO ACL 200 (INSTRUMENTATION LABORATORY)

PAULO HENRIQUE DA SILVA¹
SILVIA APARECIDA RAMOS²
VANIA ROVEDA³

1. Farmacêutico-Bioquímico graduado pela UFPR; Mestre em Genética Humana; Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR; Professor da disciplina de Hematologia II do curso de Farmácia e Bioquímica da UFPR .
2. Farmacêutica-Bioquímica graduada pela UNIVALE
3. Farmacêutica-Bioquímica graduada pela UFPR

Autores responsáveis: S.A.Ramos e V. Roveda.
E-mails: silviaaparecidaramos@hotmail.com e va.rove@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O fibrinogênio é uma proteína plasmática de alto peso molecular solúvel no plasma sanguíneo. É um polipeptídeo complexo produzido pelo fígado nos hepatócitos, apresenta a forma de um hexâmero composto por dois grupos com três polipeptídeos constituindo três diferentes pares de cadeia (alfa, beta e gama). Cada polipeptídeo é específico de um determinado gene ambos agrupados na região 50 Kb do cromossomo 4q32, (NEERMAN, 2007). O desenvolvimento do conceito de hemostasia universalmente aceito, foi introduzido por Andrew et al em 1980. Conforme opiniões diversas esses conceitos introduzidos por Andrew já não são tão apropriados frente ao grande avanço da tecnologia (MONAGLE, 2006).

Apesar do conceito da cascata da coagulação representar um significativo avanço na compreensão da coagulação e de servir por muitos anos como um modelo, recentes experimentos clínicos observados demonstram que as hipóteses da cascata não refletem completamente os eventos da hemostasia in vivo (RIDDEL et al., 2007). Um dos principais componentes da cascata da coagulação é o fibrinogênio, sendo o fator mais abundante no plasma variando em média 100 à 400 mg/dl, tendo papel de grande importância na formação do coágulo de fibrina, bem como, cofator na agregação plaquetária (LAWRIE, 1998). A cascata da coagulação é iniciada quando ocorre uma exposição do tecido subendotelial, levando a uma imediata ativação do endotélio, a qual se dá pela lesão ou dano propriamente dito ou ativação química do endotélio por meio de mediadores inflamatórios (BUTE-

NAS & MANN, 2002). O aumento de fibrinogênio no plasma está associado com o aumento de risco de eventos vasculares. Já existem drogas específicas que auxiliam na diminuição dos níveis de fibrinogênio no plasma, por exemplo agentes que diminuem a concentração lipídica e anti-hipertensivos (KAKAFIKA, 2007).

A deficiência severa pode ocorrer como doença adquirida, conseqüência da síntese reduzida secundária à falência hepática e durante o consumo pelas coagulopatias. Disfibrinogênmias congênitas e adquiridas, foram descritas, que podem conduzir a um sangramento ou levar a um estágio trombótico (LAWRIE et al., 1998), no entanto, algumas disfibrinogênmias exibem comprometimento da coagulação e diátese hemorrágica, enquanto outras apresentam uma maior tendência a trombose (HENRY, 1999). A afibrinogenemia congênita, na qual basicamente não há síntese de fibrinogênio, acarreta um distúrbio hemorrágico, o qual, paradoxalmente, não é tão severo quanto às hemofilias em termos de anormalidades articulares secundárias à hemorragia (hemartroses), HENRY, J.B., 1999. Os níveis do fibrinogênio ainda podem estar aumentados devido a mudanças fisiológicas, aos contraceptivos orais, e como proteína de fase aguda, (LAWRIE et al., 1998). Os ensaios de fibrinogênio são realizados na investigação desses episódios hemorrágicos, na monitoração da terapia trombolítica e como fator de risco para doenças coronarianas pode estar associado ao aumento da viscosidade plasmática (MACKIE et al., 2002), muitos médicos e laboratórios incluem juntamente com a dosagem de fibrinogênio, o tempo de protrombina (TAP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada

(KPTT) como um screening geral nos distúrbios hemostáticos (LAWRIE et al., 2003).

No método de Von Clauss, a dosagem do fibrinogênio se dá em analisadores automatizados ou semi-automatizados, utilizando Kits comerciais, um excesso de trombina é adicionado ao plasma teste, o tempo de coagulação é mensurado e comparado com uma curva de calibração preparada com plasma referência com concentrações conhecidas de fibrinogênio (LAWRIE et al., 2003). O ensaio do fibrinogênio de Clauss, baseado no tempo de coagulação da trombina, é a técnica mais frequentemente usada, mas sofre variações na origem e composição dos reagentes. A maioria das técnicas são padronizadas para mensurar níveis baixos de fibrinogênio e podem ter a sensibilidade ou a exatidão diferente para níveis altos (MACKIE et al., 2002).

O método do fibrinogênio PT- derivado, baseia-se na diferença entre a dispersão da luz na fase estabilizada de reação do tempo de protrombina antes da transformação do fibrinogênio em fibrina, correlaciona-se com a dosagem de fibrinogênio na amostra (PALARETTI, 1991).

Numerosos analisadores coagulométricos oferecem essa estimativa do fibrinogênio baseado na mudança da dispersão da luz ou na densidade ótica durante o tempo de protrombina, obtendo-se, então o valor de fibrinogênio derivado, juntamente com o valor do TAP. Nestes testes, a mudança da dispersão da luz, ou da densidade ótica durante a formação do coágulo, mostra um aumento progressivo até que um platô esteja alcançado. A altura desta resposta da linha de base é proporcional à concentração do fibrinogênio, LAWRIE et al., 1998.

A disponibilidade difundida do fibrinogênio estimado na prática laboratorial, levantou a necessidade de estudos e comparações sobre a variabilidade e a utilidade clínica dos diferentes ensaios (MACKIE et al., 2002). Ao realizar estes ensaios coagulométricos além da visão pré-analítica é de grande importância que se leve em consideração e crie critérios de viabilidade de amostras a fim de evitar interferentes analíticos na execução do teste, como, hiperlipidemia, hiperbilirrubinemia e hemólise, o ensaio ótico certamente é o mais afetado. Dependendo do tipo de interferência e da análise a ser realizada, alguns métodos foram estudados para minimizar a influência de tais interferências, incluindo ultracentrifugação, ultrafiltração, desproteínização, extração dos lipídeos por solventes orgânicos, pré-incubação com oxidase de bilirrubina, entre outros. Porém, estas técnicas além de tomar muito tempo podem representar grande fonte de erros, e custos adicionais (JUNKER, 2005). Assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar as duas técnicas para a dosagem de fibrinogênio, através dos analisadores BCT Dade Behring, utilizando

reagente para o teste Multifibren U, Dade Behring e ACL 200 Instrumentation Laboratory que mensura o fibrinogênio estimado por cálculo.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo de estudo: O trabalho foi realizado a partir de 50 amostras de plasmas frescos obtidos em dois laboratórios da cidade de Curitiba sendo que um deles realiza atendimento hospitalar.

Equipamentos: Os ensaios foram realizados em coagulômetro BCT (DADE BEHRING), o princípio metodológico se dá pela modificação do método de Clauss. O plasma citratado é levado à coagulação com um grande excesso de trombina. Neste caso, o tempo de coagulação depende largamente do teor de fibrinogênio da amostra.

Outro analisador utilizado foi o ACL 200 (Instrumentation Laboratory) pelo método Fibrinogênio PT- derivado. O processo de coagulação é desencadeado mediante a incubação do plasma com quantidades ótimas de trombolastina e cálcio. Mede-se o tempo que decorre até a formação do coágulo de fibrina. Pode-se também proceder à dedução do fibrinogênio através da análise da alteração do sinal ótico durante a determinação do tempo de protrombina.

Amostras: As amostras de sangue foram coletadas diretamente em tubos comerciais de vácuo (VACUETTE) com pressões negativas que contém a concentração correta do anticoagulante citrato de sódio, minimizando fontes de erro.

Após serem processadas em um laboratório as amostras foram alíquotadas (separação do plasma) e transportadas num período máximo de 12 horas, para o outro laboratório participante da pesquisa, sendo mantidas congeladas.

Reagentes: Os reagentes utilizados foram:

Multifibren U (Dade Behring): Trombina bovina, péptido retardador da agregação da fibrina; cloreto de cálcio; brometo de hexadimetrina; polietileno glicol 6000; cloreto de sódio; Tris; albumina bovina; conservante Azida de sódio. Produto apresenta-se na forma liofilizada devendo ser preparado com a quantidade de água destilada indicado no rótulo.

Thromborel S: Trombolastina liofilizada proveniente de placenta humana, cloreto de cálcio, estabilizadores, agentes de conservação (Gentamicina, 5-cloro-2-metil4-isotiazol-3-on e 2-metil-isotiazol-3-on)

A finalidade principal desse estudo consiste em comparar exclusivamente os valores (mg/dL) que são liberados pelos analisadores, independente de qualquer fator interferente.

RESULTADOS

Os resultados individuais das análises podem ser observados na Tabela 1. A média e desvio padrão foram $310,32 \pm 101,275$ para o analisador BCT, e $441,92 \pm 165,171$ para o analisador ACL 200. Os resultados foram então analisados para averiguar se existe ou não correlação ou associação entre as duas variáveis pelo coeficiente de Pearson, logo, as técnicas em estudo apresentam uma relação positiva entre si, com (valor de $r = 0,52$), porém não tão próximo de 1, sugerindo cautela quanto a confiabilidade dos resultados. A Figura 1 mostra um diagrama de dispersão onde foi ajustada uma reta de regressão linear $y=176,62+0,85x$, onde y são os valores obtidos pela técnica de fibrinogênio derivado ACL 200 e os valores de x são os valores do fibrinogênio dosado pelo BCT.

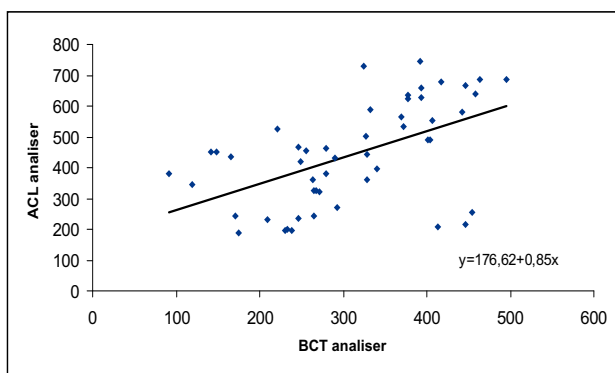


Figura 1. Diagrama de dispersão e a reta de regressão linear melhor ajustada pela relação entre as duas técnicas.

Tabela 1. Valores obtidos de fibrinogênio (mg/dl) com o aparelho BCT (Dade Behring) (I), e os valores de fibrinogênio derivado com o aparelho ACL-200 (Instrumentation Laboratory) (II).

| Amostra | I | II | Amostra | I | II |
|---------|-----|-----|---------|-----|-----|
| 1 | 393 | 626 | 26 | 293 | 269 |
| 2 | 290 | 433 | 27 | 454 | 255 |
| 3 | 407 | 553 | 28 | 249 | 420 |
| 4 | 417 | 678 | 29 | 495 | 687 |
| 5 | 255 | 454 | 30 | 442 | 580 |
| 6 | 279 | 464 | 31 | 372 | 533 |
| 7 | 324 | 729 | 32 | 328 | 442 |
| 8 | 446 | 214 | 33 | 446 | 665 |
| 9 | 247 | 468 | 34 | 463 | 685 |
| 10 | 393 | 657 | 35 | 221 | 526 |
| 11 | 327 | 502 | 36 | 265 | 243 |
| 12 | 91 | 380 | 37 | 328 | 359 |
| 13 | 119 | 347 | 38 | 369 | 566 |
| 14 | 165 | 436 | 39 | 404 | 489 |
| 15 | 149 | 452 | 40 | 171 | 244 |
| 16 | 142 | 451 | 41 | 175 | 187 |
| 17 | 265 | 325 | 42 | 267 | 324 |
| 18 | 458 | 640 | 43 | 341 | 396 |
| 19 | 279 | 382 | 44 | 246 | 237 |
| 20 | 413 | 207 | 45 | 401 | 489 |
| 21 | 333 | 589 | 46 | 231 | 195 |
| 22 | 378 | 622 | 47 | 392 | 747 |
| 23 | 238 | 198 | 48 | 378 | 634 |
| 24 | 272 | 323 | 49 | 263 | 361 |
| 25 | 233 | 200 | 50 | 209 | 233 |

DISCUSSÃO

Estudos anteriores já demonstraram ser o fibrinogênio um marcador para eventos vasculares em doenças arteriais, e a investigação de problemas hemorrágicos já é bem estabelecida bem como os métodos utilizados pela prática clínica para as dosagens de fibrinogênio, ressaltando a grande importância de relatar a origem da tromboplastina, preferencialmente escolher uma marca com pouca turbidez e considerar a categoria clínica do paciente, no que diz respeito a um quadro de sepse, doenças hepáticas, excesso de produtos de degradação da fibrina, ou casos de disfibrinogenemia, enfim casos que perturbam a polimerização da fibrina interferindo na formação final do coágulo (LAWRIE et al., 1998).

Existe uma grande variedade de métodos, reagentes e analisadores para a execução do teste para dosagem de fibrinogênio. Esse estudo teve o intuito de demonstrar a existência de correlação entre as duas técnicas, assim podemos observar que apesar das metodologias mostrarem um valor de $r = 0,52$ positivo entre si, vimos no gráfico de dispersão que a correlação linear entre as variáveis reflete certa disparidade nos resultados, já que os pontos não estão muito próximos da reta. A dificuldade em questão se trata de valores distintos obtidos de uma mesma amostra dosada por metodologias diferentes, possuírem valores de referência semelhante. O aparelho BCT faz uso para a realização do teste de fibrinogênio de um reagente próprio (MULTIFIBREN U). A exemplo de testes como tempo de protrombina se faz necessária a obtenção de uma curva padrão para a realização do teste. Essa curva de calibração para o equipamento BCT se faz por meio de três pontos que expressam então concentrações obtidas por meio de diluições pré-estabelecidas.

Esse equipamento segue o método de referência conhecido como método de Clauss. Já o aparelho ACL 200 apresenta seus resultados de fibrinogênio seguindo a curva de calibração para o teste de protrombina (TAP). Por isso os fibrinogênios são designados de fibrinogênios derivados. A tabela 1 e os gráficos apresentando os valores das concentrações de fibrinogênio obtidos para as cinquenta amostras analisadas, os quais deixam clara a grande diversidade entre as duas metodologias. Pode-se observar concentrações com elevada disparidade saindo da normalidade até mesmo para um valor dado como clinicamente alterado. As menores concentrações na grande maioria das amostras analisadas para esse estudo se deu através do aparelho BCT, o qual faz uso do método padrão de Clauss. Os valores obtidos através do equipamento ACL 200 por sua vez demonstraram concentrações bastante elevadas frente à outra metodologia em comparação.

Essa grande disparidade entre o método PT e Clauss leva a crer que o fibrinogênio derivado sofre maior interferência. Uma hipótese provável e já detalhada em outros estudos publicados faz referência a uma possível interferência na obtenção de fibrinogênio derivado para pacientes cujo resultado de TAP (tempo de protrombina) basal esteja alterado, como em pacientes em terapia anticoagulante. É possível observar valores mais elevados de fibrinogênio PT-derivado comparando com a técnica de Clauss, embora a discrepância não seja consistente em alguns casos, e podem depender do estado clínico do paciente bem como variações inerentes ao procedimento do teste, o reagente utilizado, calibrador e a combinação particular entre reagente e analisador, logo o PT-derivado pode ser menos confiável do que Clauss na investigação da diátese do sangramento, e pode ter inacurácia nas amostras com fibrinogênio elevado (MACKIE et al., 2002).

Para essa classe de pacientes seria então esperado um valor aumentado de fibrinogênio frente às amostras dosadas por meio do método do TP-derivado. Esse trabalho foi realizado com uma população de estudo de origem hospitalar, sendo alguns destes pacientes tratados com alguma terapia anticoagulante, ou seja, com TAP alterado. Dessa forma não é possível fazer uma correlação exata da clínica desses pacientes com a variabilidade de resultados apresentada.

O objetivo era elucidar e demonstrar se uma mesma amostra submetida a diferentes metodologias para a dosagem da concentração de fibrinogênio (já que se utiliza o mesmo valor de referência para qualquer que seja o método empregado) teria como resultado um valor semelhante ou não, respeitando um limite de confiabilidade.

CONCLUSÃO

A comparação dos valores obtidos das cinquenta amostras analisadas entre os métodos Clauss (Método padrão, representado nesse estudo pelo aparelho BCT) e método do tempo de protrombina (fibrinogênio derivado ACL-200) mostrou variabilidade significativa nos resultados, apesar de ter uma relação positiva mostrado pelo coeficiente de correlação, merecendo atenção já que os valores de referência empregados são utilizados de forma igual para ambas as metodologias. Podemos concluir com este estudo a importância da padronização do método de escolha que se adapte adequadamente a rotina do laboratório, ou seja, no que se refere ao público alvo. É interessante estabelecer uma espécie de limite de corte ou especificação para situação clínica ou terapêutica do paciente para poder utilizar a metodologia do TP- Derivado por exemplo, já que a dosagem de fibrinogênio por

este método sofre sensivelmente alterações no aumento do tempo de protrombina, seja de origem medicamentosa ou patológica

AGRADECIMENTOS

Ao professor Paulo Henrique pelo incentivo e orientação neste projeto e também ao professor Yoshio Hashimoto pela excelente pós graduação oferecida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUTENAS, S.; MANN, K.G. Blood Coagulation. **Biochemistry**, Moscou, v. 67, n. 1, 3-12, 2002.

HENRY, J.B. **Diagnósticos Clínicos e Tratamento por Métodos Laboratoriais**. 19 ed. São Paulo: Manole, 1999. 247p.

HOFFMANN, J.J.M.L.; VERHAPPEN, M.A.L. Automated nephelometry of fibrinogen: analytical performance and observations during thrombolytic therapy. **Clinical Chemistry**, Netherlands, v.34, n.10, 2135-2140, 1988.

JUNKER, R. et al. Interferences in coagulation tests – evaluation of the 570- nm method on the Dade Behring BCS analyzer. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v.2, n.43, 244-252, 2005.

KAKAFIKA, A.I.; LIBEROPOULOS, E.N.; MIKHAILIDIS, D.P. Fibrinogen: a predictor of vascular disease. **Curr Pharm Des**, London, v. 13, 1647, 2007.

LAWRIE, A.S. et al. Prothrombin time derived fibrinogen determination on Sysmex CA-6000. **Journal Clinical Pathology**, London, n.51, 462-466, 1998.

LAWRIE, I.J. et al. Guidelines on fibrinogen assays. **British Journal of Haematology**, London, n. 121, 396-404, 2003.

MACKIE, I.J. et al. A performance evaluation of commercial fibrinogen reference preparations and assays for Clauss and PT-derived fibrinogen. **Thromb Haemost**, Stuttgart, n. 87, 997-1005, 2002.

MONAGLE, P. et al. Developmental haemostasis. Impact for clinical haemostasis laboratories. **Thrombosis Haemostasis**, publicado em, v. 95, n. 2, ver pág, 2006.

NEERMAN, V.A. Molecular mechanisms accounting for fibrinogen deficiency: from large deletions to intracellular retention of misfolded proteins. **Journal Thrombosis Haemostasi**, publicado em, v. 5, n. 1, 125-131, 2007.

PALARETTI, G. et al. Fibrinogen assays: a collaborative study of six different methods. **Clinical Chemistry**, Bologna, v. 37, n. 5, 714-719, 1991.

RIDDEL, J.P.Jr, et al. Theories of blood coagulation. **Journal Pediatr Oncol Nurs**, Oakland, v.23, n.3, 123, 2007.