

## Valores de Referência para tempos de coagulação em uma população de cães de Porto Alegre, RS, Brasil

Reference Values for Coagulation Time of Dogs in Porto Alegre, RS, Brazil

Magnus Larruscaim Dalmolin<sup>1,2</sup>, Camila Serina Lasta<sup>2</sup>, Luciana de Almeida Lacerda<sup>2</sup>, Elisa Rocha de Araújo<sup>2</sup>, Mariana Loner Coutinho<sup>1</sup> & Itabajara da Silva Vaz Junior<sup>1,2</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (PTT) are screening tests for coagulopathies in dogs. Both tests measure the clotting ability by the activation of different parts of the coagulation cascade. These tests vary widely in terms of reference parameters, mainly due the considerable diversity of reagents and analyzers available. In addition, there are many variations inherent to different populations, and little has been published about coagulation reference parameters for the local dog population. The main objective of the present study was to determine a clotting time reference range of a dog population in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

**Materials, Methods & Results:** Hemostatic reference range was determined from citrated plasma of 268 clinically healthy dogs of both genders. The animals did not present bleeding diathesis or thrombocytopenia history. All dogs were previously submitted to clinical examination (cardiopulmonary auscultation, abdominal palpation, and rectal temperature) and laboratory screening (complete blood count, creatinine, albumin, and alanine aminotransferase). PT and PTT of 71 and 258 samples were measured, respectively. Blood samples were collected into 2.7 mL 3.2 % sodium citrate tubes (9 parts blood : 1 part citrate) by vacuum. Blood samples were centrifuged; the plasma was harvested and stored at -30 °C upon analyses. All analyses were performed using the viscosity detection method in semi-automatic coagulometer according to manufacturer's guidelines. The reference ranges were determined in accordance with the *American Society for Veterinary Clinical Pathology*. The PT and PTT reference ranges were between 6.06 to 9.32 s and between 15.25 to 24.57 s, respectively.

**Discussion:** The increased activity of the extrinsic pathway clotting factor generates narrow values in the PT assay, in comparison to PTT results. PT results were similar to previous reports, which may be attributed to minor variations that exist between the PT reagent kits. All PT kits are comprised of tissue thromboplastin and Ca<sup>2+</sup>. Basically, there are three sources of thromboplastin for the PT reagents: recombinant tissue factor, tissue thromboplastin, and combined thromboplastin. This narrow range of components make TP results vary little, irrespective of the brand reagent. On the other hand, PTT results were broader and differed from previous reports. PTT reagents are more diverse and less standardized than PT reagents. It is the combination of the clotting activator, phospholipid, calcium chloride molarity, ionic strength, buffers, and stabilizer system that determines the properties of the reagent. The clotting activators most commonly used are ellagic acid, kaolin, micronized silica, and celite. These compounds have different properties, and are all used in different PTT reagents as clotting activators. Phospholipids are platelet substitutes and accelerate the reactions, and may also come from different sources. Furthermore, no reference range for PTT using reagents based on micronized silica as the clotting activator is available for dogs, which may explain the different reference range obtained for this parameter. Moreover, the higher PTT values may be a characteristic of this specific dog population. The PT and PTT values obtained in this study can be used as reference values in local laboratories based on the same methodology.

**Keywords:** hemostasis, prothrombin time, activated partial thromboplastin time, reference values, dogs.

**Descritores:** hemostasia, tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, valores de referência, cães.

## INTRODUÇÃO

A hemostasia é um processo fisiológico que tem como objetivos a manutenção da integridade e do fluxo vascular, e o controle da hemorragia e da trombose [1,22]. Nas coagulopatias, os pacientes apresentam sinais hemorrágicos como hematomas e hemorragias profundas [10,11].

Apesar da importância de um histórico detalhado e de um exame clínico acurado, testes laboratoriais são necessários para identificar a maioria dos transtornos da hemostasia. O tempo de protrombina (TP) e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA) são utilizados para avaliar a atividade geral da coagulação [2,4,7,21].

A interpretação do resultado dos testes de coagulação é um processo de análise comparativa, ou seja, os resultados do paciente são comparados com um intervalo de referência [14]. Assim, a determinação destes intervalos é fundamental para a prática clínica da medicina veterinária e o presente trabalho tem como objetivo determinar valores de referência de TP e TTPA canino, com o uso de reagentes para testes de coagulação em plasma humano, através de método semiautomático, por sistema de detecção de viscosidade.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 268 cães, machos e fêmeas, sem padrões raciais definidos, sem histórico de hemorragia e/ou trombocitopenia. Os animais foram provenientes de hospital veterinário, laboratório veterinário ou banco de sangue veterinário de Porto Alegre/RS. Além disso, todos os cães foram submetidos a avaliação clínica (ausculta cardiopulmonar, palpação abdominal, avaliação de mucosas, hidratação corporal e temperatura retal) e laboratorial (hemograma, albumina, creatinina e alanina aminotransferase). Após serem considerados clinicamente saudáveis, foram colhidos por sistema a vácuo 2,7 mL de sangue em tubos com anticoagulante citrato de sódio a 3,2 % (proporção 9:1) para obtenção de plasma. As amostras foram colhidas através de punção da veia jugular externa, cefálica ou safena lateral, após tricotomia e antissepsia local. As amostras foram centrifugadas a 1500 g por 15 min, e o plasma separado em frações (3 a 5), que foram congeladas (-30 °C) e armazenadas até o momento da análise.

Para as determinações do TP foram utilizadas amostras de 71 cães. Estas foram descongeladas a 37°C por um a três min imediatamente antes de serem

analisadas. As amostras de plasma foram incubadas a 37°C por um min, e então a coagulação iniciada pela adição de cálcio, tromboplastina tecidual e um inibidor de heparina (Neoplastine® CI Plus)<sup>1</sup>. O tempo foi cronometrado automaticamente até a coagulação da amostra.

Para que a distribuição dos resultados do TTPA atingisse a normalidade, foram utilizadas amostras de 258 cães, descongeladas como previamente descrito. O plasma foi incubado a 37°C por três min com cefalina e sílica em reagente tamponado (PTT Automate 5)<sup>1</sup>, e a partir da adição de CaCl<sub>2</sub> 25 mM, o tempo até a coagulação da amostra foi cronometrado. Todas as análises de coagulação foram realizadas conforme instruções do fabricante, em coagulômetro semiautomático pelo método de coagulação - sistema de detecção de viscosidade (STart 4 Hemostasis Analyzer STart®)<sup>1</sup>.

Os intervalos de referência foram determinados conforme ASVCP (*American Society for Veterinary Clinical Pathology*), após a identificação de *outliers* [6]. A distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson. Os limites de referência para TP foram determinados a partir dos valores médios da população normal  $\pm 2$  desvios padrão. Para o TTPA, o intervalo de referência foi construído após classificação dos dados, determinação dos percentis 2,5 e 97,5 % e obtenção do intervalo de confiança de 95 %. As análises foram executadas em software comercial (GraphPad Prism 6.0, GraphPad Software, CA, EUA).

## RESULTADOS

Segundo ASVCP, quando a amostragem é superior a 120 indivíduos, recomenda-se que o intervalo de referência seja determinado através de métodos não paramétricos, com 95 % de confiança [6]. Assim, foi obtido um intervalo de referência do TTPA de 15,25 a 24,57 s. Para a determinação do intervalo do TP em um grupo de 71 indivíduos foi seguida a recomendação de se utilizar a média  $\pm$  dois desvios padrão, e o resultado obtido foi de 6,06 a 9,32 s. Ambas as distribuições passaram no teste de normalidade e não foram identificados valores atípicos na população estudada. Os intervalos de referência para TP e TTPA estão apresentados na Tabela 1. As distribuições dos tempos de coagulação da amostra populacional de referência estão apresentadas na Figura 1.

**Tabela 1.** Estatística descritiva e limites de referência para TP e TTPA para a população de cães avaliada, com intervalo de confiança de 95%.

Parâmetro	TP (s)	TTPA (s)
Média (desvio padrão)	7,69 (+/-0,81)	19,44 (+/-2,33)
Limite inferior de referência	6,06	15,25
Limite superior de referência	9,32	24,57
Mínimo - máximo	5,30 - 10,00	13,00 - 26,60
N	71	258

**Tabela 2.** Intervalos de referência descritos na literatura para TP em cães.

N	Equipamento	Reagente	IR (s)
56	STA Compact	STA Neoplastine Plus	5,7 – 8,0 [3]
139	STA Satellite	STA Neoplastine CI Plus	6,9 – 8,8 [8]
60	STA-R Evolution	STA Neoplastine CI Plus	7,1 – 9,2 [8]
50	Schnitger & Gross	Thromborel S	5,7 – 7,1 [3]
50	Schnitger & Gross	Neoplastine Plus	6,6 – 8,6 [3]
50	Schnitger & Gross	Thromboplastin-M	6,5 – 8,5 [3]
50	Schnitger & Gross	Thromboplastin-IS	6,3 – 7,3 [3]
50	Schnitger & Gross	Innovin	5,5 – 7,3 [3]
40	Manual	HemoStat Thromboplastin-SI	4,0 – 9,6 [12]
71	Start 4	Neoplastine CI Plus	6,0 – 9,3 <sup>a</sup>

IR: intervalo de referência. <sup>a</sup> Dalmolin et al.

**Tabela 3.** Intervalos de referência descritos na literatura para TTPA em cães.

N	Equipamento	Reagente	IR (segundos)
56	STA Compact	STA APTT Kaolin	10,0 - 14,3 [3]
139	STA Satellite	STA Cephascreen	13,1 – 17,2 [8]
60	STA-R Evolution	STA Cephascreen	12,9 – 17,3 [8]
40	Manual	HemoStat aPTT-EL	11,9 – 18,3 [12]
258	Start 4	PTT Automate 5	15,2 – 24,5 <sup>*</sup>

IR: intervalo de referência. <sup>\*</sup> Dalmolin et al.

## DISCUSSÃO

O TP e o TTPA fazem parte dos testes de coagulação de triagem e são referidos como parâmetros básicos na avaliação da hemostasia secundária [4]. O TP é um teste sensível para detectar defeitos na via extrínseca e/ou defeitos na via comum, apresentando valores prolongados em casos de intoxicação por dicumarínicos, doença hepática, deficiências específicas de fator e coagulopatia de consumo, enquanto o

TTPA identifica anormalidades de coagulação das vias intrínseca e via comum da coagulação, sendo utilizado como triagem no diagnóstico de hemofilias e doença de von Willebrand [1,3,20].

O TP foi introduzido como um teste para a protrombina plasmática antes de que muitos fatores de coagulação que participam da reação fossem descobertos. O TP é realizado pela adição de tromboplastina tecidual e Ca<sup>2+</sup> ao plasma com anticoagulante citrato

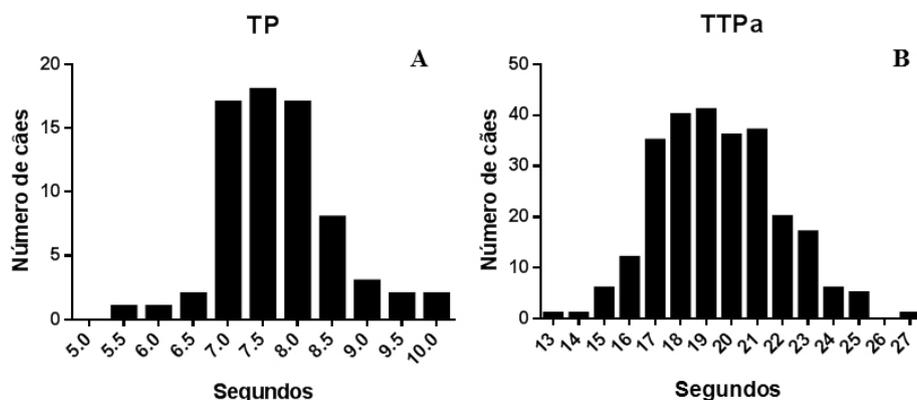


Figura 1. Histograma de distribuição dos valores de TP (A) e TTPa (B) da população de cães.

de sódio, e então é avaliado o tempo decorrente até a formação do coágulo. O TTPa é realizado pela incubação do plasma com tromboplastina parcial e um ativador de fator XII e subsequente adição de cloreto de cálcio, seguido da cronometragem do tempo para formação do coágulo [13].

A disponibilidade de avaliação laboratorial da hemostasia é muito importante para o diagnóstico e tratamento destas doenças, entretanto, reagentes de uso exclusivamente veterinário não estão disponíveis comercialmente e se faz necessária adaptação de reagentes de uso humano [8,12,15]. Apesar da transferência de intervalos de referência ser amplamente utilizada na patologia clínica (principalmente em parâmetros de bioquímica clínica), a determinação de intervalos próprios em cada laboratório é a forma mais indicada para se interpretar resultados de exames laboratoriais [7,14,16]. Além disso, diferentes resultados para parâmetros de coagulação são descritos quando se avaliam diferentes grupos de cães e quando se utilizam diferentes reagentes e métodos - manuais, semiautomáticos, automáticos, ou testes rápidos [5,8,9,12,18,23].

A maior atividade dos fatores de coagulação envolvida nas vias extrínseca e comum faz com que os intervalos de referência descritos para o TP sejam mais baixos e estreitos que os intervalos para TTPa [8,12,13,17,19]. Na Tabela 2 pode ser observado que os intervalos de referência para TP canino encontrados neste estudo são semelhantes aos citados na literatura, mesmo quando se variam os instrumentos e reagentes. Isto pode ser atribuído ao fato de que os reagentes de TP variam pouco, pois a tromboplastina tecidual e o  $Ca^{2+}$  continuam sendo os reagentes base para o teste, independentemente do kit ou equipamento. Basicamente,

existem três fontes de tromboplastina para os reagentes de TP: fator tecidual recombinante, tromboplastina tecidual (proveniente de cérebro de coelho e placenta humana) e tromboplastina combinada (tromboplastina de cérebro de bovino diluída em fração de fibrinogênio adsorvida a plasma bovino). O  $Ca^{2+}$  pode ser adicionado ao reagente durante a manufatura ou imediatamente antes do teste, dependendo do reagente [13].

Por outro lado, os reagentes de TTPa são mais diversificados e menos padronizados que os reagentes de TP. Os ativadores utilizados mais comumente são o ácido elágico, o caulim, a sílica micronizada e o celite. Todos esses compostos são usados nos diferentes reagentes de TTPa e possuem a mesma função de ativação do mecanismo de coagulação. Os fosfolípidos são substitutos plaquetários e aceleram as reações. As fontes de fosfolípidos são cérebro de coelho, cefalina (cérebro de coelho desidratado), cérebro de bovino e soja. Usualmente são usadas misturas com diferentes tipos de fosfolípidos, incluindo a fosfatidilserina negativamente carregada. É a combinação do ativador de contato, fosfolípido, molaridade do cloreto de cálcio, força iônica, sistema de tampões e estabilizantes que determina as propriedades do reagente [13]. Na Tabela 3 pode ser observada a maior variação nos intervalos de referência descritos para o TTPa de cães, que se deve principalmente às variações dos ativadores utilizados em cada reagente (caulim e ácido elágico). Pelo conhecimento dos autores, não há intervalo de referência para TTPa em cães com reagentes que adotam a sílica como ativador, e isto pode justificar o maior intervalo para este parâmetro de coagulação observado neste trabalho. Além disso, este maior valor de TTPa pode ser uma característica específica da população de cães avaliada.

## CONCLUSÃO

Os reagentes de uso humano podem ser utilizados em amostras caninas, desde que padronizados para tal fim e que sejam obtidos e aplicados valores de referência para a espécie. Os valores de TP e TTPa neste estudo podem ser utilizados como valores referência em laboratórios locais que utilizem a mesma metodologia empregada. Os resultados de TTPa foram diferentes daqueles publicados previamente, devido a utilização de outros reagentes, ou a uma característica da população estudada.

## MANUFACTURER

<sup>1</sup>Diagnóstica Stago. Paris, France.

**Acknowledgements.** This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Ethical approval.** Samples used in this study were obtained with owners consent, and the procedures were approved by the institutional animal care use committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (No. 24925).

**Declaration of interest.** None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## REFERENCES

- 1 Baker D.C. 2007. Diagnóstico dos distúrbios hemostáticos. In: Thrall M.A. (Ed). *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, pp.170-187.
- 2 Barr J.W. & McMichael M. 2012. Inherited disorders of hemostasis in dogs and cats. *Topics in Companion Animal Medicine*. 27(2): 53-58.
- 3 Bauer N., Eralp O. & Moritz A. 2009. Reference intervals and method optimization for variables reflecting hypocoagulatory and hypercoagulatory states in dogs using the STA Compact (R) automated analyzer. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 21(6): 803-814.
- 4 Brooks M.B. & Catalfamo J.L. 2013. Current diagnostic trends in coagulation disorders among dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice*. 43(6): 1349-1372.
- 5 Evans G.O. & Flynn R.M. 1992. Activated partial thromboplastin time measurements in citrated canine plasma. *Journal of Comparative Pathology*. 106(1): 79-82.
- 6 Friedrichs K.R., Harr K.E., Freeman K.P., Szladovits B., Walton R.M., Barnhart K.F. & Blanco-Chavez J. 2012. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*. 41(4): 441-453.
- 7 Geffre A., Concordet D., Trumel C. & Braun J.P. 2011. Validation of preexisting reference intervals: can the procedure be applied to canine hemostasis? *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23(2): 343-347.
- 8 Geffre A., Grollier S., Hanot C., Vergez F., Trumel C. & Braun J.P. 2010. Canine reference intervals for coagulation markers using the STA Satellite (R) and the STA-R Evolution (R) analyzers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 22(5): 690-695.
- 9 Hennen J.K., Elokda H., Leal M., Ji A., Friedrichs G.S., Morgan G.A., Swillo R.E., Antrilli T.M., Hreha A. & Crandall D.L. 2005. Evaluation of PAI-039 [1-benzyl-5-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-indol-3-yl}(oxo)acetic acid], a novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor, in a canine model of coronary artery thrombosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 314(2): 710-716.
- 10 Johnstone I. 2002. Bleeding disorders in dogs 1. Inherited disorders. *In Practice*. 24(1): 2-10.
- 11 Johnstone I. 2002. Bleeding disorders in dogs 2. Acquired disorders. *In Practice*. 24(2): 62-68.
- 12 Lopes S.A., Emanuelli M.P., Schmidt C., Raiser A.G., Mazzanti A. & Alves A.S. 2005. Valores de referência do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em cães. *Ciência Rural*. 35(2): 381-384.
- 13 Lubas G., Caldin M., Wiinberg B. & Kristensen A.T. 2010. Laboratory testing of coagulation disorders. In: Weiss D.J. & Wardrop K.J. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edn. Ames: Wiley-Blackwell, pp.1082-1100.
- 14 Marlar R.A. 2009. Hemostasis test validation, performance and reference intervals. In: Kitchen S., Olson J.D. & Preston F.E. (Eds). *Quality in Laboratory Hemostasis and Thrombosis*. West Sussex: Blackwell's publishing, pp.9-18.
- 15 Medeiros L.P.M. & Blanco B.S. 2009. Tempo de protrombina e de tromboplastina parcial ativada em caprinos criados extensivamente no Estado do Rio Grande do Norte. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 10(1): 231-235.
- 16 Mineo H.K. & Garabed R.B. 2007. Evaluation of a bench-top coagulation analyzer for measurement of prothrombin

- time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen concentrations in healthy dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 68(12): 1342-1347.
- 17 Mischke R. & Nolte I. 1997. Optimization of prothrombin time measurements in canine plasma. *American Journal of Veterinary Research*. 58(3): 236-241.
- 18 Nielsen L.N., Wiinberg B., Hansen M.K., Jensen A.L. & Kristensen A.T. 2011. Prolonged activated thromboplastin time and breed specific variation in haemostatic analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs. *Veterinary Journal*. 190(1): 150-153.
- 19 Rizzo F., Papasoullotis K., Crawford E., Dodkin S. & Cue S. 2008. Measurement of prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) on canine citrated plasma samples following different storage conditions. *Research in Veterinary Science*. 85(1): 166-170.
- 20 Silva P.H. & Hashimoto Y. 2006. *Coagulação - visão laboratorial da hemostasia primária e secundária*. Rio de Janeiro: Reinventer, 136p.
- 21 Smith J.W., Day T.K. & Mackin A. 2005. Diagnosing bleeding disorders. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 27(11): 828-843.
- 22 Smith S.A. 2010. Overview of hemostasis. In: Weiss D.J. & Wardrop K.J. (Eds). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6th edn. Ames: Wiley-Blackwell, pp.635-653.
- 23 Tseng L.W., Hughes D. & Giger U. 2001. Evaluation of a point-of-care coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and activated clotting time in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 62(9): 1455-1460.