

DETERMINAÇÃO DE RNI

SUSANA R. SOUSA

Serviço de Imuno-Hemoterapia. Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil.
Centro Regional do Porto. Porto

RESUMO

O autor pretende tornar acessível a todo o pessoal médico e técnico, nomeadamente aos que trabalham em laboratório, os fundamentos e a evolução histórica da determinação da Razão Normalizada Internacional (RNI). Foi feita uma revisão bibliográfica exaustiva dos estudos realizados pelos principais organismos envolvidos na calibração das tromboplastinas, base da avaliação do Índice de Sensibilidade Internacional (ISI).

SUMMARY

Determination of the International Normalized Ratio

The author explains the nature, reason and practical implications of determining the International Normalized Ratio (INR) for all clinicians and technical personnel, mainly those who work in laboratories. An exhaustive revision is made of the studies performed by the centres involved in thromboplastin calibration exercises to obtain the International Sensivity Index (ISI) values.

ESTANDARDIZAÇÃO DO TP

O tempo de tromboplastina ou tempo de protrombina de Quick (TP) avalia a via extrínseca da coagulação quando em presença de um excesso de tromboplastina. É o teste de rastreio para detecção de patologias congénitas e adquiridas da via extrínseca e universalmente utilizado na monitorização da hipocoagulação por antivitaminicos k.

A standardização surgiu como uma necessidade¹ devido à constatação dos seguintes factos:

1- Baixa concordância dos resultados fornecidos pelos centros devido ao uso de diferentes reagentes (sensibilidade muito variável das tromboplastinas à deficiência dos factores da coagulação dependentes da vitamina k) e/ou métodos (teste de Quick e Thrombotest, usando técnicas manuais e automatizadas).

2- Uso de diferentes modos de expressão dos resultados: tempo (seg.), razão (TPd / TPn), índice (TPn/ TPd) e actividade (%).

3- Grande variação dos limites terapêuticos dos anticoagulantes orais.

A implicação clínica relaciona directamente a dosagem dos anticoagulantes orais e consequente intensidade da

hipocoagulação com o risco de trombose/ hemorragia².

Assim, os principais objectivos da standardização são obter maior uniformidade, segurança e eficácia da terapêutica anticoagulante oral³.

EVOLUÇÃO HISTÓRICA

Foram dados os primeiros passos⁴ com :

- Introdução de esquemas uniformes para testar e expressar os resultados;
- Calibração de tromboplastinas relativamente a uma tromboplastina de referência;
- Uso de plasmas de referência standardizados para caracterizar o comportamento da tromboplastina;
- Adopção de um modelo de cálculo estatístico

1. Esquema de Manchester (1969)

Primeira tentativa feita por Poller com a Manchester Comparative Reagent (MCR).

2. Modelo de BIGGS-DENSON (1967)

Observação empírica da relação linear existente entre as razões dos TP obtidas com diferentes tromboplastinas.

Com a disponibilidade de um reagente nacional, de um modelo de calibração e partindo da teoria que as tromboplastinas podem ser comparadas a um material de referência, surgem esquemas nacionais, dos quais o melhor exemplo é o esquema inglês (Quadro I).

Quadro I - Esquema nacional inglês para standardização do TP

- Manchester Comparative Reagent (MCR), adoptada em 1969, pelo British Committee for Standards in Haematology como o reagente nacional.
- Resultados do TP fornecidos como razão.
- Lotes de MCR após monitorização e avaliação re-designados British Comparative Thromboplastin (BCT) e fornecidos a todos os laboratórios para calibração.
- Introdução de uma técnica standardizada para o TP e de um esquema para calibrar lotes sucessivos de BCT.

MCR: preparação líquida fenolizada

BCT: preparação liofilizada

3. Estudo ICTH/ICSH (1974)

Estudo multicêntrico que envolveu 199 laboratórios e foi realizado sob os auspícios do International Committee on Thrombosis and Haemostasis (ICTH) e do International Committee for Standardisation in Haematology (ICSH).

Pretendeu relacionar os TP obtidos com diferentes tromboplastinas e avaliar os métodos de obtenção da linha de calibração. Ocorreu a observação acidental de que a precisão da linha de calibração estava relacionada com a semelhança entre a tromboplastina a calibrar e a de referência.

4. Esquema WHO (1977)

A tromboplastina 67/40 (humana, combinada) foi designada como a primeira Preparação de Referência Internacional Primária (1ª PRI I), contra a qual todas as tromboplastinas deviam ser calibradas. As tromboplastinas 70/178 (coelho, simples) e 68/434 (bovino, combinada) como PRI II, destinadas a calibrar tromboplastinas do mesmo tipo e origem.

O valor de calibração calculado para uma tromboplastina corresponde ao declive da linha de calibração quando as razões dos TP obtidas com a 1ª PRI I são representadas no eixo horizontal e os da tromboplastina a calibrar no eixo vertical - Constante de Calibração Internacional (CCI). Foi estipulado que a tromboplastina 67/40 tivesse um CCI de 1,0 e que a linha de calibração fosse estabelecida por avaliação visual (Quadro IV).

A estimativa da razão que seria obtida se se tivesse usado a 1ª PRI I denomina-se Razão de Calibração

Internacional (RCI) e calcula-se por:

$$RCI = (\text{RAZÃO OBSERVADA} - 1) / \text{CCI} + 1$$

Surgiram limitações a este esquema (Quadro II), que obrigaram à sua revisão e estabelecimento de nova nomenclatura⁴.

Quadro II - Limitações ao esquema original da WHO

- Problemas relacionados com a tromboplastina 67/40
 - composição e "idade" do reagente
 - depleção do stock
 - ausência de estudos de estabilidade
 - técnica Thrombotest-like
- Dificuldades atribuídas ao modelo de calibração de Biggs-Denson
 - linha de calibração ter de passar pelo ponto (1,1)
 - linha de calibração aparentemente curva

5-Esquema WHO revisto - Kirkwood (1983)

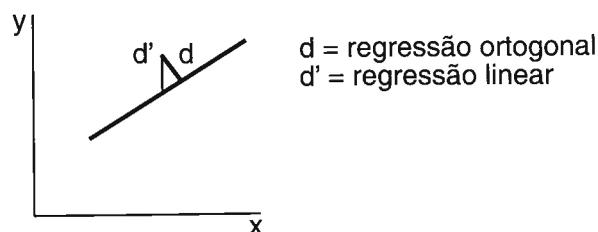
A tromboplastina 67/40 foi substituída pela BCT/253 (humana, simples), tendo sido designada como 2ª PRI I. Foram designadas as PRI II: RBT/79 (coelho, simples) e OBT /79 (bovino, combinada).

O valor de calibração⁵⁻⁷ calculado para uma tromboplastina corresponde ao declive da linha de calibração quando os log TP obtidos com a 2ª PRI I são colocados no eixo vertical e os da tromboplastina a calibrar no eixo horizontal para o mesmo conjunto de plasmas normais e de doentes hipocoagulados - Índice Sensibilidade Internacional (ISI). A BCT/253 apresenta um ISI de 1.08⁸. A linha de calibração é calculada por um método estatístico de regressão ortogonal (Quadros III e IV).

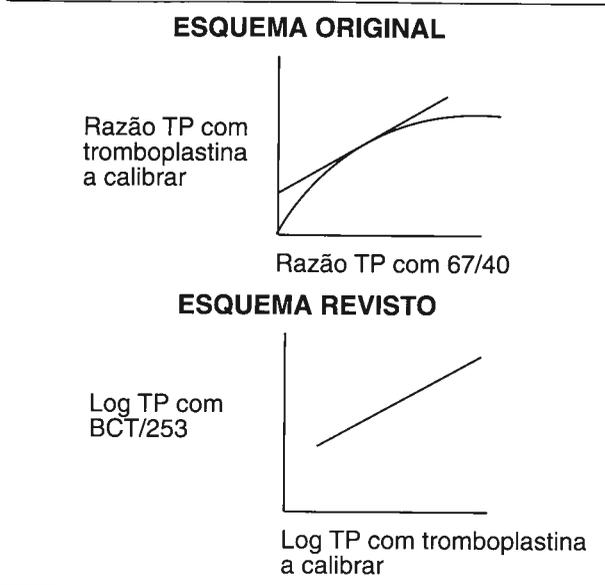
Quadro III - Método estatístico de cálculo da linha de calibração

REGRESSÃO ORTOGONAL

- Método estatístico que minimiza os desvios quadrados numa direcção perpendicular à linha.
- Resulta de uma estimativa simétrica da relação funcional e da precisão, permitindo a derivação de testes de linearidade.
- Está implícito no método a suposição de que o erro estatístico em ambos os eixos é semelhante em magnitude.



Quadro IV - Comparação entre o esquema original e o revisto



A estimativa da razão que seria obtida se se tivesse usado a 1ª. PRI denomina-se Razão Normalizada Internacional (RNI) e calcula-se por:

$$RNI = (\text{RAZÃO TP})^{ISI}$$

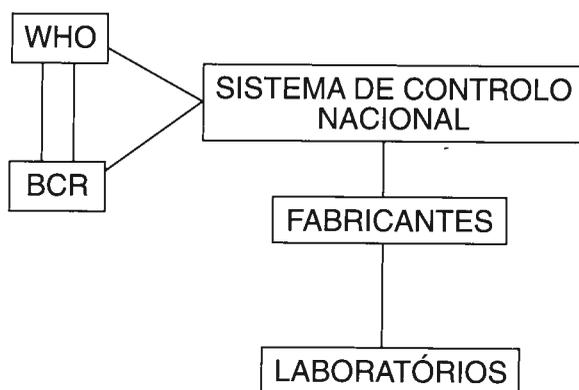
Os valores de RNI podem ser interpretados sem cálculos através de um nomograma estabelecido por Poller em 1982.

IMPLEMENTAÇÃO DA RNI

A implementação deste esquema passa pelo fornecimento de tromboplastinas, sua organização e procedimentos de calibração recomendados.

A World Health Organization (WHO) limita o fornecimento das tromboplastinas de referência aos laboratórios de controlo nacional. O European Community Bureau of Reference (BCR) tem venda livre aos fabricantes de tromboplastina (Quadro V).

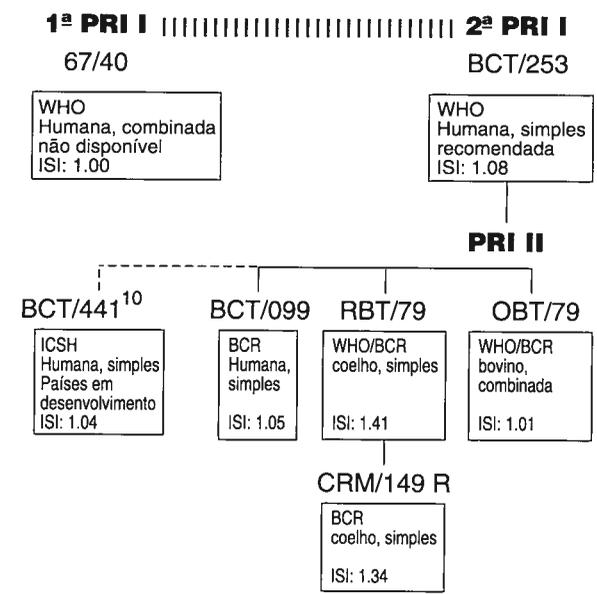
Quadro V - Fornecimento de tromboplastinas



Os fabricantes devem ter um standard próprio (ou tromboplastina de trabalho) para calibrar os lotes de tromboplastinas. Devem ainda designar o ISI da sua tromboplastina e enviar uma tabela de conversão.

Em termos organizacionais, o modelo das preparações de referência é hierárquico (Quadro VI)⁹. Começa pela BCT/253 que, segundo os últimos estudos de degradação acelerada pelo calor, mantém-se estável¹⁰; no entanto, verifica-se depleção do stock, pelo que é necessário pensar em nova PRI I.

Quadro VI - Modelo hierárquico das preparações de referência



A calibração das preparações de referência deve ser cuidadosa, multicêntrica e estandardizada¹. Maior precisão é obtida quando se comparam tromboplastinas com idêntica composição e origem. O exercício de calibração deve incluir, por dia, amostras de plasmas de 2 controlos normais e de 6 doentes hipocoagulados e estabilizados há pelo menos 6 semanas e deve decorrer durante 10 dias (Coeficiente de Variação < 3%).

A calibração de uma tromboplastina de trabalho pode ser unicêntrica⁴ e o seu ISI é obtido multiplicando o ISI da preparação de referência pelo declive da linha de calibração.

A calibração de lotes sucessivos de tromboplastinas pode ser realizada com um pool de plasmas liofilizados ou congelados contendo, pelo menos, 20 dádivas de doadores saudáveis ou de hipocoagulados estabilizados há pelo menos 6 semanas. Podem usar-se plasmas frescos, contendo um número não superior a quatro normais e 12 doentes.

A necessidade de um elevado número de plasmas proporciona maior dispersão dos pontos relativamente à linha de calibração, o que reflecte uma variação biológica genuína e valida a linha de calibração.

CAUSAS DE ERRO NA DETERMINAÇÃO DA RNI

Teoricamente, usando reagentes com determinado ISI, os resultados de RNI em doentes a fazer anticoagulantes orais devem ser os mesmos apesar da tromboplastina empregue. Na prática, isto nem sempre se comprova (Quadro VII)¹¹.

Quadro VII - Causas de erro na determinação da RNI Adaptado de Poller and Thomson, 1993¹¹

- | | |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 - Razão TP incorrecta | |
| 1.1 Determinação do TP | <ul style="list-style-type: none"> - Variáveis pré-analíticas - Variações na técnica - Detecção do ponto final |
| 1.2 Determinação do TP médio normal | |
| 2 - ISI incorrecto | |
| 2.1 Calibração incorrecta | |
| 2.2 Alteração no ISI | |
| 2.3 Fraca distribuição das amostras cumarínicas | |
| 2.4 Escolha incorrecta da preparação de referência | |
| 3 - RNI incorrecto | |

A técnica de venopunção, o material de colheita, a concentração de citrato¹², a velocidade e a duração da centrifugação, a temperatura ambiente, a demora na realização do teste são as variáveis pré-teste com maior interesse em referir.

O momento da formação do coágulo pode ser determinado por avaliação visual, óptica ou electromecânica. A técnica manual é o procedimento recomendado nos exercícios de calibração e pode induzir alterações na RNI por variações na técnica². Múltiplos estudos tentaram esclarecer a polémica.

O uso da razão diminui os efeitos da automatização, nomeadamente a menor precisão, mas não os elimina. É proposto um factor de correcção para o instrumento¹, o uso de uma tromboplastina de alta sensibilidade², a calibração do sistema reagente / instrumento^{3,11} e a aplicação alargada dos plasmas de referência³ para ajudar a resolver o problema. No entanto, começaram a surgir alguns estudos a demonstrar a variabilidade intra-instrumento e uma aproximação dos resultados manuais aos automatizados em algumas situações².

Cada laboratório deve determinar o seu TP médio normal para cada lote de reagente usando amostras frescas de plasmas normais, diariamente, de um grande número de indivíduos. O método de cálculo recomendado é a média geométrica, obtida pelo antilog das médias dos log TP individuais. Como alternativa, pode usar-se um pool de plasmas normais congelados ou liofilizados¹³.

Nos exercícios de calibração, as amostras de plasmas de doentes a fazer dicumarínicos devem ser representativas dos níveis de hipocoagulação terapêuticos (Quadro VIII).

Quadro VIII - Distribuição das amostras cumarínicas Adaptado de Poller and Thomson, 1993¹¹

RNI	Nº Plasmas
1.5 - 2.0	4 - 8
2.0 - 2.5	8 - 12
2.5 - 3.0	8 - 12
3.0 - 3.5	8 - 12
3.5 - 4.0	4 - 8

A escolha da preparação de referência tem fundamental importância na determinação do ISI da tromboplastina a calibrar. A precisão da calibração (ou Coeficiente de Variação, CV), é uma medida da variação interlaboratorial e depende da composição e ISI das tromboplastinas comparadas.

A composição idêntica entre a tromboplastina a calibrar e a de referência diminui a variação interlaboratorial¹⁴⁻¹⁷. Quanto mais baixo o ISI, maior a sensibilidade da tromboplastina às alterações induzidas pelos dicumarínicos e maior a precisão da calibração. Isto implica menor erro na conversão da razão em RNI e menor variabilidade interlaboratorial (o CV da RNI aproxima-se do CV da razão multiplicado pelo ISI)¹⁸⁻²².

O uso de tromboplastinas com ISI > 1.6 pode ser particularmente perigoso porque pequenos prolongamentos do TP e da razão podem denotar uma grande alteração na hipocoagulação sanguínea²³.

AVALIAÇÃO CLÍNICA

A questão que importa pôr é se a implementação de RNI vai resultar em melhores regimes de profilaxia e tratamento das doenças tromboembólicas pelos anticoagulantes orais. Foi demonstrado em vários estudos^{24,25} o benefício para o doente. Permanece a polémica sobre a determinação dos níveis terapêuticos seguros e eficazes para cada patologia.

VALIDADE DA RNI EM DOENTES COM INSUFICIÊNCIA HEPÁTICA

Nos anos 80, diferentes autores estabeleceram que a RNI devia ser aplicada apenas à monitorização do efeito anticoagulante oral em doentes estabilizados²⁶. Em meados de 90, começam a surgir estudos que avaliam a eficácia de RNI em doentes com insuficiência hepática, coagulação intravascular disseminada e outras coagulopatias²⁷⁻²⁹. No entanto, são necessários *guidelines* para essas situações e consenso sobre o ISI mais apropriado das tromboplastinas a utilizar nestas patologias.

AGRADECIMENTOS

A M. Campos e I. Pereira pela leitura crítica do manuscrito.

BIBLIOGRAFIA

1. TOMENSON JA, THOMSON JM: Standardisation of the prothrombin time. In: Thomson JM (ed) Blood Coagulation and Haemostasis: a practical guide. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1985: 370-409.
2. THOMSON JM: The implementation of INR for standardisation of the prothrombin time in oral anticoagulant control. In: Thomson JM (ed) Blood Coagulation and Haemostasis: a practical guide. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1991: 261-285.
3. POLLER L: Oral anticoagulants and heparin: standardisation of laboratory monitoring. In: Poller L., Thomson JM (ed) Thrombosis and its management. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993: 200 - 213.
4. HERMANS J, VAN DEN BESSELAAR AMHP, LOELIGER EA, VAN DER VELDE EA: A collaborative calibration study of reference materials for thromboplastins. *Thromb Haemost* 1983; 50(3): 712 - 717.
5. KIRKWOOD TBL: Calibration of reference thromboplastins and standardisation of the prothrombin time ratio. *Thromb Haemost* 1983; 49(3): 238 - 244.
6. GOGSTAD GO, WADT J, SMITH P, BRYNILDSTRUD T: Utility of a modified calibration model for reliable conversion of thromboplastin times to INR. *Thromb Haemost* 1986; 56 (2): 178 - 182.
7. VAN DEN BESSELAAR AMHP, VAN HALEM-VISSER LP, HOEKSTRA - SCHUMAN M, VAN NIEUWKOOP W, LOELIGER EA: Simplified thromboplastin calibration. *Thromb Haemost* 1980; 43 (1): 53 - 57.
8. THOMSON JM, TOMENSON JA, POLLER L: The calibration of the second primary international reference preparation for thromboplastin. *Thromb Haemost* 1984; 52(3): 336 - 342.
9. THOMSON JM, DARBY KV, POLLER L: Calibration of BCT/441, the ICSH reference preparation for thromboplastin. *Thromb Haemost* 1986; 55(3): 379 - 382.
10. POLLER L, PULFORD J, STEVENSON KJ, COOPER P, GAMBLE P, THOMSON JM: Long-term stability studies on the WHO IRP for thromboplastin (human plain BCT/253). *Thromb Haemost* 1994; 72(5): 682 - 684.
11. POLLER L: Problems of international normalized ratio implementation in prothrombin time standardisation. In: Poller L (ed) Recent advances in blood coagulation 6. London: Churchill Livingstone, 1993: 155-168.
12. DUNCAN EM, CASEY CR, DUNCAN BM, LLOYD JV: Effect of concentration of trisodium citrate anticoagulant on calculation of the INR and the ISI of thromboplastin. *Thromb Haemost* 1994; 72(1): 84 - 88.
13. PETERS RHM, VAN DEN BESSELAAR AMHP, OLTHUIS FMFG: Determination of the mean normal prothrombin time for assessment of INR. *Thromb Haemost* 1991; 66(4): 442 - 445.
14. VAN DEN BESSELAAR AMHP, BERTINA RM: Multi-center study of thromboplastin calibration precision - Influence of reagent species, composition and ISI. *Thromb Haemost* 1993; 69(1): 35-40.
15. KITCHEN S, WALKER ID, WOODS TAL, PRESTON FE: Thromboplastin related differences in the determination of INR: a cause for concern? *Thromb Haemost* 1994; 72(3): 426 - 429.
16. TRIPODI A, ARBINI AA, CHANTARANGKUL V, BETTEGA D, MANNUCCI PM: Are capillary whole blood coagulation monitors suitable for the control of oral anticoagulant treatment by the INR? *Thromb Haemost* 1993; 70(6) : 921 - 924.
17. VAN DEN BESSELAAR AMHP: Multi-center study of replacement of the international reference preparation for thromboplastin, rabbit, plain. *Thromb Haemost* 1993; 70(5): 794 - 799.
18. PALARETI G, COCCHERI S, POGGI M et al: Oral anticoagulant therapy control: evidence that INR expression improves the inter-laboratory comparability of results - the Bologna oral anticoagulant control exercise. *Thromb Haemost* 1987;58(3): 905-910.
19. TS'AO C, SWEDLUND J, NEOFOTISTOS D: Implications of use of low ISI thromboplastins in prothrombin time testing. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118:1183-1187.
20. FINAZZI G, FALANGA A, GALLI M, CORTELAZZO S, REMUZZI A, BARBUI T: Recombinant versus high - sensitivity conventional thromboplastin: a randomized clinical study in patients on oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 1994; 72(6): 804 - 807.
21. TRIPODI A, CHANTARANGKUL V, BRAGA M et al: Results of a multicenter study assessing the status of standardisation of a recombinant thromboplastin for the control of a oral anticoagulant therapy. *Thromb Haemost* 1994; 72(2): 261 - 267.
22. BADER R, MANNUCCI PM, TRIPODI A et al: Multicentric evaluation of a new PT reagent based on recombinant human tissue factor and synthetic phospholipids. *Thromb Haemost* 1994; 71(3): 292 - 299.
23. LAFFAN MA, BRADSHAW AE: Laboratory control of anticoagulant, thrombolytic and anti-platelet therapy. In: Dacie JV, Lewis SM (ed) Practical Haematology. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1995: 367-380.
24. VAN DEN BESSELAAR AMHP: The significance of the INR for oral anticoagulant therapy. *IFCC* 1991; 3 : 146 - 153.
25. LOELIGER EA, VAN DEN BESSELAAR AMHP, LEWIS SM: Reliability and clinical impact of the normalization of the prothrombin times in oral anticoagulant control. *Thromb Haemost* 1985 ; 53: 148:154.
26. LOELIGER EA, POLLER L, SAMAMA M et al: Questions and answers on prothrombin time standardisation in oral anticoagulant control . *Thromb Haemost* 1985 : 54 (2): 515 - 517.
27. KOEPKE JA: Is the INR also "valid" for prothrombin times measured in patients not receiving oral anticoagulants ? *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118 : 1181 - 1182.
28. KOVACS MJ, WONG A, MACKINNON K et al: Assessment of the validity of the INR system for patients with liver impairment. *Thromb Haemost* 1994 ; 71 (6) : 727 - 730.
29. DENSON KWE, REED SV, HADDON ME: Validity of the INR system for patients with liver impairment. *Thromb Haemost* 1995 ; 73 (1) : 162.