UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
DOUTORADO EM DOENÇAS TROPICAIS E INFECCIOSAS

EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DOS DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS NOS ACIDENTES BOTRÓPICOS NO ESTADO DO AMAZONAS

SÂMELLA SILVA DE OLIVEIRA

MANAUS
2019

SÂMELLA SILVA DE OLIVEIRA

EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DOS DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS NOS ACIDENTES BOTRÓPICOS NO ESTADO DO AMAZONAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado**,** para obtenção grau de *Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas.*

Orientador: **Dr. Wuelton Marcelo Monteiro**

Coorientadora: **Dra. Ida Sigueko Sano-Martins**

MANAUS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a). **Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

Oliveira, Sâmella Silva de

Epidemiologia e patogênese dos distúrbios hemostáticos nos acidentes botrópicos no Estado do Amazonas / Sâmella Silva de Oliveira. Manaus: [s.n], 2019.
f.: color.; cm.

Tese – Pós-Graduação em Medicina Tropical – Doutorado em Doenças Tropicais e Infecciosas
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
Inclui bibliografia
Orientador: Monteiro, Wuelton Marcelo
Coorientadora: Sano-Martins, Ida Sigueko

1.*Bothrops*. 2. Envenenamento por serpente. 3. Hemostasia. 4. Antivenenos.
I. Monteiro, Wuelton Marcelo (Orient.). II. Sano-Martins, Ida Sigueko (Coorient.).
III. Universidade do Estado do Amazonas.
IV. Epidemiologia e patogênese dos distúrbios hemostáticos nos acidentes botrópicos no Estado do Amazonas.

FOLHA DE JULGAMENTO

EPIDEMIOLOGIA E PATOGÊNESE DOS DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS NOS ACIDENTES BOTRÓPICOS NO ESTADO DO AMAZONAS

SÂMELLA SILVA DE OLIVEIRA

"Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Doenças Tropicais e Infecciosas, aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado".

Banca julgadora:

_____

Presidente

_____

Membro

_____

Membro

_____

Membro

_____

Membro

DEDICATÓRIA

A todos os pacientes que aceitaram participar desta pesquisa, sem os quais este estudo não teria sido possível de ser realizado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Wuelton Marcelo Monteiro, pela oportunidade de pesquisar no meu doutorado sobre acidentes ofídicos na Amazônia, por me orientar e dividir seus conhecimentos, e pela confiança a mim depositada na realização deste estudo.

À minha coorientadora, Dra. Ida Sigueko Sano-Martins, pela oportunidade de tê-la me orientando no Aprimoramento Profissional, Mestrado e Doutorado, e por dividir sua experiência no estudo dos distúrbios hemostáticos observados nos acidentes ofídicos.

À Eliane Campos Alves pela ajuda, disponibilidade e amizade, sendo meu braço direito no recrutamento dos participantes desta pesquisa.

Aos alunos de Iniciação Científica Alessandra dos Santos Santos, João Pedro Tavares Pereira, Lybia Kássia dos Santos Sarraff, Elizandra Freitas do Nascimento e Alisson Santos que tanto contribuíram no recrutamento e coleta de dados dos participantes desta pesquisa, e que me possibilitaram ser orientadora também.

Ao Dr. Iran Mendonça da Silva que me apoiou incondicionalmente no acompanhamento dos pacientes durante o seguimento destes na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, tornando esta pesquisa possível.

Ao Hiochelson Najibe dos Santos Ibiapina pela ajuda no recrutamento dos participantes desta pesquisa e suporte nas análises estatísticas realizadas neste estudo.

À Dra. Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett pelas contribuições nas revisões dos manuscritos e disponibilização de recursos para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Vanderson de Souza Sampaio e ao José Diego de Brito Sousa pelo suporte nas análises estatísticas realizadas neste estudo.

Ao Dr. Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda e ao Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira, cujas contribuições e sugestões enriqueceram esse trabalho.

À Hedylamar Oliveira Marques e à Socorro Costa, do laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, pelo suporte técnico na realização das dosagens dos fatores de coagulação e atenção dispensada para comigo.

À Dra. Ana Maria Moura-da-Silva, do laboratório de imunopatologia do Instituto Butantan, pelas contribuições nas revisões dos manuscritos e disponibilização de recursos para a realização desta pesquisa.

À Dra. Luciana Aparecida Freitas de Sousa, do laboratório de imunopatologia do Instituto Butantan, pela ajuda na realização das dosagens dos fatores de coagulação. Uma amiga de Santarém.

Ao Jorge Carlos Contreras Bernal pela ajuda na coleta de dados das serpentes trazidas pelos pacientes.

À Dra. Mônica Colombini, do laboratório de imunopatologia do Instituto Butantan, pelas dosagens de veneno e antiveneno, e ajuda na realização das dosagens dos fatores de coagulação.

À Dra. Hui Wen Fan, da Divisão Bioindustrial do Instituto Butantan, pelas sugestões e revisões dos manuscritos.

Às equipes médica, de enfermagem e do laboratório da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, as quais nos apoiaram durante o recrutamento e seguimento dos pacientes, possibilitando que pudéssemos concluir a coleta de dados do estudo.

Ao Dr. Luis Roberto de Camargo Gonçalves, diretor técnico do laboratório de fisiopatologia do Instituto Butantan, que permitiu que eu realizasse as dosagens de fatores de coagulação no laboratório; e a todos que nele trabalham pelo apoio nos dias em que estive lá.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade do Estado do Amazonas em convênio com a Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, que proporcionou meu aprendizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical por todos os ensinamentos e pela contribuição no meu processo de aprendizado.

Aos colegas da turma de Mestrado e de Doutorado pela companhia durante as disciplinas e seminários.

Às funcionárias da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Conceição Tufic e Altariza Freitas, pela disponibilidade e incondicional apoio durante o doutorado.

À Socorro Almeida, funcionária da secretaria do Departamento de Pesquisa – Programa de Apoio à Iniciação Científica (DEP-PAIC), pelo apoio e orientações com os meus alunos de iniciação científica.

Ao grupo de pesquisa do qual faço parte, o Centro de Pesquisa Clínica em Envenenamento por Animais (CEPCLAM), pelas discussões a respeito da temática, sugestões e contribuições nesse estudo, em especial Pedro Bisneto, Monique Freire, Dra. Valéria Mourão-de-Moura, Dr. Cláudio Monteiro Jr e Dr. Fernando Val.

Aos funcionários do Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, que apoiaram direta ou indiretamente na execução desse estudo, em especial ao Eduardo Serrão, Elcimar Júnior, Tereza Sanches, Lúcia Mota, Erecilda, Marly Melo, Dra. Gisely Melo, Waldirene Fernandes, Mônica Costa, Flávia Lima, Paula Vincentin e Augustto Aleksey Lima.

Ao Geraldo Majela Soares pelo apoio e suporte neste estudo.

Ao Matthew Miller pela correção do inglês dos manuscritos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES- que me concedeu uma bolsa durante a realização deste doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e CAPES/PROCAD pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

A Deus, a quem pertence todas as coisas. A Ele seja dada toda a Glória!

Aos meus pais, José Oliveira e Édila Oliveira, que não mediram esforços para que eu chegasse até aqui e sempre me apoiaram nas minhas decisões. Eu agradeço por tudo!

Aos meus irmãos, Suanne Oliveira e Maxwell Oliveira, pelo companheirismo e apoio incondicional na vida e nos estudos.

À minha família (avós, tios e primos), em especial à minha tia Elbe Rabelo, que me acompanhou de perto durante esses quatro anos de doutorado.

A todos que participaram direta ou indiretamente da minha vida acadêmica seja ensinando, contribuindo, apoiando, incentivando ou orando.

Meu muito obrigada!!!

DECLARAÇÃO DAS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Esta tese foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD) sob número de concessão 2992/2014, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ/UNIVERSAL) sob número de concessão 428525/2016-4; e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM/PPSUS) sob número de concessão 287/2013.

Bolsa durante o período de doutoramento: CAPES (modalidade doutorado).

Os financiadores não tiveram nenhum papel no desenho dos estudos, coleta de dados, análise de dados, preparação de manuscritos ou decisão sobre a publicação de dados.

EPÍGRAFE

“(...) Orgulhamo-nos ver que de algum modo contribuímos para o benefício da coletividade, para o benefício de todos os brasileiros, do Brasil inteiro. Já fizemos alguma coisa, mas há muito a fazer ainda. É nosso dever continuar trabalhando”.

Vital Brasil, 1910

RESUMO

Introdução: A serpente *Bothrops atrox* causa a maioria dos acidentes ofídicos na Amazônia brasileira. Os acidentes botrópicos caracterizam-se por manifestações clínicas locais e sistêmicas, tais como as alterações da coagulação e sangramentos. O veneno de *B. atrox* não faz parte do *pool* de imunização utilizado na produção do antiveneno administrado no tratamento dos acidentes botrópicos. No entanto, a variabilidade na composição e atividades biológicas dos venenos de serpentes poderia repercutir diretamente na necessidade de antivenenos mais efetivos na Amazônia brasileira e na gravidade das manifestações clínicas. **Objetivo**: Estudar a epidemiologia e patogênese dos distúrbios hemostáticos nos acidentes botrópicos. **Metodologia**: 1) Os prontuários de pacientes com diagnóstico clínico-epidemiológico de acidente botrópico tratados na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT/HVD), entre agosto/2013 e julho/2016, foram utilizados para coleta de variáveis clínico-epidemiológicas e laboratoriais. Para verificar os fatores associados com os sangramentos sistêmicos, os pacientes com sangramentos sistêmicos foram classificados como casos e aqueles sem sangramentos sistêmicos foram considerados controles. 2) Os pacientes com diagnóstico clínico-epidemiológico de acidente botrópico tratados na FMT/HVD, nos anos de 2016 e 2017, tiveram o tempo de coagulação, níveis de veneno sérico, contagem plaquetária e fatores de coagulação determinados durante a admissão hospitalar, 12, 24, 48 horas após a administração do antiveneno e na alta hospitalar. **Resultados:** 1) O sangramento sistêmico foi observado em 15,3% dos acidentes botrópicos. A incoagulabilidade sanguínea e trombocitopenia foram independentemente associadas com sangramento sistêmico. 2) Níveis baixos de fator V, fator II, fibrinogênio, plasminogênio e alfa 2- antiplasmina, e níveis elevados de fator tissular, produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina e D-dímero foram observados em pacientes com incoagulabilidade sanguínea. A contagem mediana plaquetária apresentou níveis dentro da normalidade. Essas características também foram observadas em pacientes com sangramento sistêmico. Os níveis de veneno não foram correlacionados com o tempo de coagulação nem com os níveis de fatores de coagulação. Os distúrbios hemostáticos observados nos acidentes botrópicos recuperaram até a alta hospitalar. **Conclusão:** A incoagulabilidade sanguínea e trombocitopenia foram fatores associados com o risco de desenvolvimento de sangramento sistêmico após um

acidente botrópico. As mudanças nos níveis de fatores de coagulação foram similares àquelas encontradas em acidentes causados por *B. jararaca*. Por outro lado, poucos casos de trombocitopenia foram observados neste estudo. Os antivenenos produzidos no Brasil foram capazes de recuperar os distúrbios hemostáticos nos acidentes botrópicos nesta parte da Amazônia brasileira.

Palavras-chave: *Bothrops*, envenenamento por serpente**,** hemostasia, antivenenos.

ABSTRACT

Introduction: *Bothrops atrox* snakes are responsible for most snakebites in humans in the Brazilian Amazon. *Bothrops* snakebites present local and systemic clinical manifestations, such as coagulation disorders and bleeding. However, *B. atrox* venom is not part of the immunization pool used in the production of antivenom administered in the treatment of *Bothrops* snakebites. Moreover, the variability in the composition and biological activities of snake venoms could directly affect the need for more effective antivenoms in the Brazilian Amazon and in the severity of the clinical manifestations. **Objective:** To study the epidemiology and pathogenesis of hemostatic disorders in *Bothrops* snakebites. **Methods**: 1) Patients with clinical-epidemiological diagnosis of *Bothrops* snakebite who were attended to at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) between August, 2013 and July, 2016 had their records used to collect clinical–epidemiological and laboratorial data. The patients' records were analysed in order to verify the factors associated with systemic bleeding. Patients with systemic bleeding were classified as cases and those without systemic bleeding were considered as controls. 2) Patients with clinical and epidemiological diagnosis of *Bothrops* snakebite who were attended to at the FMT-HVD, in 2016 and 2017, had coagulation time, serum venom levels, platelet count and coagulation factors determined on admission, and at 12, 24, and 48 hours after beggining antivenom therapy and also on discharge. **Results:** 1) Systemic bleeding was observed in 15.3% of *Bothrops* snakebites. Unclottable blood and thrombocytopenia were independently associated with systemic bleeding. 2) Low levels of factor V, factor II, fibrinogen, plasminogen and alpha 2- antiplasmin, and elevated levels of tissue factor, fibrin/fibrinogen degradation products and D-dimer were observed in patients with unclottable blood. The median platelet count presented levels within the normal range. These characteristics were also observed in patients with systemic bleeding. Venom levels were not correlated with coagulation time nor with coagulation factor levels. The hemostatic disorders observed in the *Bothrops* snakebites returned to normal until the discharge. **Conclusion:** Unclottable blood and thrombocytopenia were factors associated with the risk of developing systemic bleeding after a *Bothrops* snakebite. The changes in levels of coagulation factors were similar to that of *B. jararaca* snakebite. On the other hand, a few cases of

thrombocytopenia were observed in this study. The antivenoms produced in Brazil were able to remedy the hemostatic disorders in this part of the Brazilian Amazon.

Keywords: *Bothrops*, snake envenomation, hemostasis, antivenoms.

RESUMO LEIGO

A jararaca, também conhecida como surucucurana, surucucu, surucucu-do-barranco, boca-podre ou comboia, causa a maioria das picadas por serpentes na Amazônia brasileira. Uma pessoa picada por essa serpente pode apresentar dor e inchaço no local da picada, alterações no sangue e sangramentos. O veneno da jararaca encontrada na Amazônia brasileira não é utilizado na produção do soro administrado no tratamento dos acidentes causados por jararaca. São utilizados os venenos de jararaca da região Sul e Sudeste do Brasil. Os venenos de serpentes podem variar dependendo do sexo, fase de crescimento, origem geográfica e habitat do animal. Isso poderia influenciar diretamente na necessidade de um soro mais específico para o tratamento dos acidentes causados por jararaca na Amazônia brasileira, assim como na gravidade dos sinais e sintomas após o acidente por jararaca. Esse trabalho avalia as alterações no sangue e os sangramentos após acidente por jararaca em Manaus, na Amazônia brasileira, e a recuperação desses com o tratamento soroterápico. Os sangramentos foram observados em 15,3% dos acidentes causados por jararaca neste estudo. Houve uma relação entre as alterações no sangue e as chances de a vítima apresentar sangramentos. O soro utilizado no tratamento dos acidentes causados por jararaca foi capaz de recuperar as alterações no sangue e os sangramentos observados nesta parte da Amazônia brasileira.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do número de acidentes ofídicos e mortes 1
Figura 2. Distribuição espacial dos acidentes botrópicos na Amazônia brasileira de 2010 a 2015 3
Figura 3. A serpente *Bothrops atrox*, principal espécie envolvida nos acidentes na Amazônia brasileira.....4
Figura 4. Manifestações locais após acidente botrópico 5
Figura 5. Sangramentos sistêmicos após acidente botrópico.....6
Figura 6. Hemorragia no sistema nervoso central após caso fatal de acidente botrópico em Manaus, Brasil.....7
Figura 7. Fase de iniciação da coagulação 10
Figura 8. Fase de amplificação da coagulação 11
Figura 9. Fase de propagação da coagulação 12
Figura 10. A ação do veneno de serpentes *Bothrops atrox* sobre a coagulação.....15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteínas de venenos de serpentes que atuam sobre o sistema hemostático 13

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Número de frasco-ampolas de antiveneno indicado para acidente botrópico de acordo com a gravidade clínica 8

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

a	Ativado
ADP	Adenosina difosfato
Aids	Síndrome da imunodeficiência adquirida (em inglês: “acquired immuno-deficiency syndrome”)
AOR	Razão de chances ou razão de possibilidades ajustada (em inglês: “adjusted odds ratio”)
AP	Atividade de protrombina
AUROC	Área sob a curva ROC (em inglês: “area under ROC curve”)
B. alternatus	*Bothrops alternatus*
B. atrox	*Bothrops atrox*
B. bilineatus	*Bothrops bilineatus*
B. brazili	*Bothrops brazili*
B. jararaca	*Bothrops jararaca*
B. jararacussu	*Bothrops jararacussu*
B. marajoensis	*Bothrops marajoensis*
B. moojeni	*Bothrops moojeni*
B. neuwiedi	*Bothrops neuwiedi*
B. taeniatus	*Bothrops taeniatus*
CAPES	Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior—Brasil
CEPCLAM	Centro de pesquisa clínica em acidentes por animais
CI	Intervalo de confiança (em inglês: “confidence interval”)
Clot	Sangue coagulável (em inglês: “clottable blood”)
CNPq	Conselho nacional de desenvolvimento científico e Tecnológico
DHL	Desidrogenase láctica
Dis	Alta hospitalar (em inglês: “on discharge”)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (em inglês: “ethylenediamine tetraacetic acid”)
EIA	Ensaio imunoenzimático (em inglês: “enzyme immune assays”)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (em inglês: “enzyme-linked immunosorbent assay”)
F	Fator de coagulação

FII	Fator II ou protrombina
FIIa	Fator II ativado ou trombina
FV	Fator V
FVa	Fator V ativado
FVII	Fator VII
FVIIa	Fator VII ativado
FVII/TF	Complexo fator VII/fator tissular
FVIII	Fator VIII
FIX	Fator IX
FX	Fator X
FXa	Fator X ativado
FXI	Fator XI
FXIa	Fator XI ativado
FXIII	Fator XIII
FDP	Produtos de degradação de fibrina/fibrinogênio (em inglês: “fibrin/fibrinogen degradation product”)
Fig	Figura (em inglês: “figure”)
FMT-HVD	Fundação de medicina tropical Dr. Heitor Vieira Dourado
FT	Fator tissular
F(ab)’$_2$	Dois fragmentos de união ao antígeno
GpIb	Glicoproteína Ib
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfónico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (em inglês: “human immuno-deficiency virus”)
INR	Razão normalizada internacional (em inglês: “international normalized ratio”)
IQR	Intervalo interquartil (em inglês: “interquartile range”)
IPCCB	Instituto de pesquisa clínica Carlos Borborema
LWCT	Tempo de coagulação de Lee-White (em inglês: “Lee-White clotting time”)
MPV	Volume plaquetário médio (em inglês: “mean platelet volume”)
n	Número
Non-SB	Sem sangramento sistêmico (em inglês: “non – systemic bleeding”)

OMS	Organização mundial de saúde
OPD	Orto-fenilenodiamina (em inglês “ortho-phenylenediamine”)
OR	Razão de chances ou razão de possibilidades bruta (em inglês: “crude odds ratio”)
PAIs	Inibidores de ativador de plasminogênio (em inglês: “plasminogen activator inhibitors”)
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PC	Proteína C
PDFs	Produtos de degradação da fibrina
PGE_1	Prostaglandina E_1
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA_2	Fosfolipases A_2 (em inglês: “phospholipases A_2”)
POPs	Procedimentos operacionais padrão
PPSUS	Programa pesquisa para o SUS
PROCAD	Programa nacional de cooperação acadêmica
PT	Português
ROC	Característica de operação do receptor (em inglês: “receiver operating characteristics”)
SAB	Antiveneno botrópico
SABC	Antiveneno botrópico-crotálico
SABL	Antiveneno botrópico-laquético
SB	Sangramento sistêmico (em inglês: “systemic bleeding”)
SINAN	Sistema de informação de agravos de notificação
S.D.	Desvio padrão (em inglês: “standard deviation”)
SVMPs	Metalopreoteases de veneno de serpente (em inglês: “snake venom metalloproteinases”)
SVSPs	Serinopreoteases de veneno de serpente (em inglês: “snake venom serine proteinases”)
TC	Tempo de Coagulação
TFPI	Inibidor da via do fator tissular
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética
TGP	Transaminase glutâmico-pirúvica
TP	Tempo de protrombina

t-PA	Ativador do plasminogênio do tipo tecidual
T0	Na admissão hospitalar e antes do antiveneno
T12	Doze horas após administração do antiveneno
T24	Vinte e quatro horas após administração do antiveneno
T48	Quarenta e oito horas após administração do antiveneno
Unclot	Sangue incoagulável (em inglês: “unclottable blood”)
u-PA	Ativador do plasminogênio do tipo uroquinase
vs.	Versus
vWF	Fator von Willebrand
WBCT 20	Tempo de coagulação em sangue total em 20 minutos (em inglês: “whole blood clotting test”)
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaH_2PO_4	Fosfato monossódico
r	Coeficiente de correlação
=	Igual
>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
%	Porcentagem
º	Graus
°C	Graus Celsius
bpm	Batimentos por minuto
cm	Centímetro
fL	Fentolitro
g	Força gravitacional
g/dL	Grama por decilitro
g/L	Grama por mililitro
h	Hora
Km	Quilômetro

L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mg/dL	Miligrama por decilitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
mM	Milimolar
ng/mL	Nanogramas por mililitro
nm	Nanômetro
pg/mL	Picogramas por mililitro
rpm	Respiração por minuto
v/v	Volume por volume
µL	Microlitro
µg/mL	Microgramas por mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Epidemiologia dos Acidentes Ofídicos 1
1.2. A Serpente *Bothrops atrox* e o Acidente Botrópico 3
1.3. Os Venenos de Serpentes e a Hemostasia 9
1.3.1. Hemostasia 9
1.3.2. A Ação do Veneno de *Bothrops atrox* sobre a Hemostasia 13
1.4. Relevância 16
2. OBJETIVOS 18
2.1. Geral 18
2.2. Específicos 18
3. PRODUTO DA TESE 19
3.1. Manuscrito científico 1 (redigido conforme normas da revista *Toxins*, na qual foi publicado) 19
3.2. Manuscrito científico 2 (redigido conforme normas da revista *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, à qual será submetido) 47
3.3. Manuscrito científico 3 (redigido conforme normas da revista *Clinical Toxicology*, na qual se encontra em revisão) 68
4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS 93
5. CONCLUSÃO 95
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 96
7. ANEXOS E APÊNDICES 104
7.1. Procedimentos operacionais padrão utilizados na tese 104
7.2. Instrumentos de coleta de dados 164
7.3. Parecer ético 181
7.4. Produção Científica em estudos complementares durante o curso de doutorado 183
7.4.1. Artigos completos publicados ou aceitos para publicação 183
7.4.2. Capítulo de livros 191

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia dos Acidentes Ofídicos

Os acidentes ofídicos representam um importante problema de saúde pública, sendo atualmente reconhecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como sendo parte do grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (1). Eles constituem importante causa de morbidade e mortalidade, especialmente na Ásia, África Subsaariana, América Latina e partes da Oceania. As estimativas globais mostram que são registrados anualmente pelo menos 1.8 milhões de acidentes ofídicos e 81.000 mortes. Na América Latina e Caribe ocorrem anualmente pelo menos 137.000 acidentes ofídicos e 3.400 mortes (Figura 1) (2). Os países com baixo produto interno bruto, baixo índice de desenvolvimento humano e baixos gastos com saúde são os mais afetados, observando-se assim uma forte associação entre a mortalidade causada por acidente ofídico e a pobreza (3).

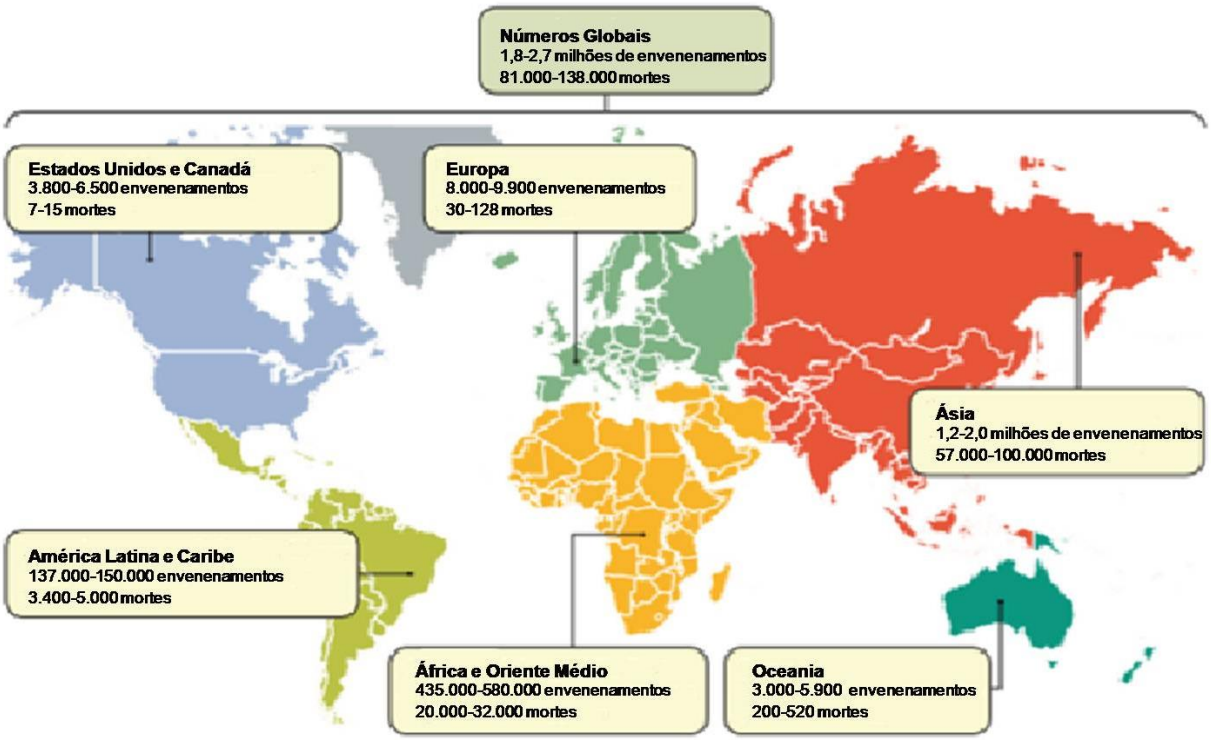


Figura 1. Distribuição geográfica do número de acidentes ofídicos e mortes. Fonte: Adaptado de Gutierrez et al. (2).

No Brasil, em 2017, os dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) reportaram aproximadamente 28.000 acidentes ofídicos, com uma letalidade média estimada de 0,4%. Os grupos mais vulneráveis a esses acidentes são indivíduos do sexo masculino (77%) e na faixa etária entre 20 e 59 anos, demonstrando um perfil de doença ocupacional (4). A Amazônia brasileira reporta a maior incidência de acidente ofídico no país, com 52,6 casos por 100.000 habitantes (5). No Estado do Amazonas foi estimada uma média de incidência anual de 52,8 casos por 100.000 habitantes, com uma letalidade de 0,6% (6). Os fatores epidemiológicos associados com casos fatais de acidentes ofídicos são a distância de ocorrência >300 Km de Manaus, capital do Estado do Amazonas, a idade da vítima ≥61 anos e a etnicidade indígena, assim como o intervalo de tempo entre o acidente e a assistência no serviço de saúde >6 horas (6,7).

O gênero *Bothrops* é o principal responsável pelos acidentes ofídicos na Amazônia brasileira (87,0%), seguido por *Lachesis* (7,9%), *Crotalus* (4,7%) e *Micrurus* (0,4%), diferentemente do observado nas demais regiões do país, em que os gêneros *Bothrops* e *Crotalus* ocasionam a maioria dos acidentes (4,8). Contudo, muitas vezes a identificação do gênero da serpente causadora do acidente não é realizada ou então preenchida na ficha de notificação compulsória, o que acaba resultando em um elevado número de casos ignorados/branco nos registros (4). Da mesma forma, estes valores podem estar subestimados devido à considerável subnotificação desses acidentes, principalmente em áreas remotas da Amazônia brasileira (6,9,10). O Noroeste do Estado do Amazonas, Norte de Roraima, Norte do Pará, na fronteira com o Amapá e parte central do estado do Tocantins apresentam as maiores incidências de acidentes botrópicos na Amazônia brasileira (Figura 2). Além disso, esses acidentes são mais incidentes em áreas de planícies, com cobertura vegetal original preservada, com maior precipitação e maior umidade relativa do ar (8).

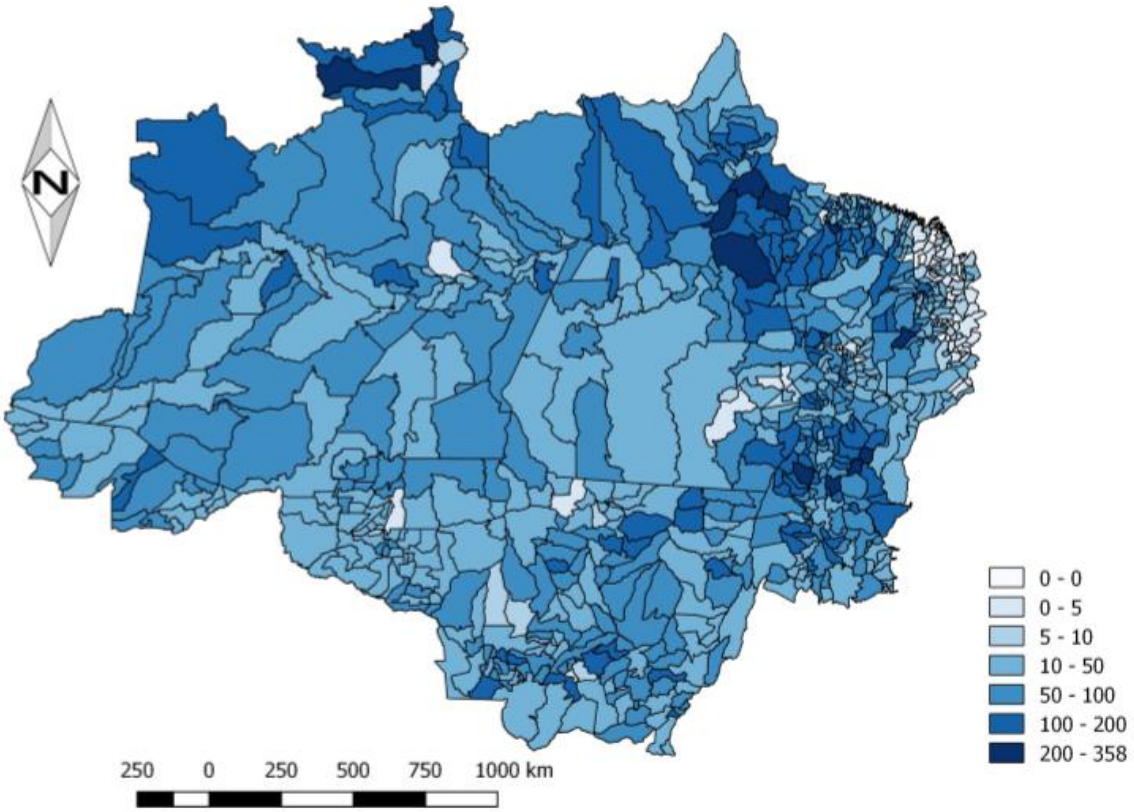


Figura 2. Distribuição espacial dos acidentes botrópicos na Amazônia brasileira de 2010 a 2015. O mapa foi criado usando incidência por 100.000 habitantes. Fonte: Alcântara et al. (8).

Apesar dos estudos realizados para entendimento e controle dos acidentes ofídicos na Amazônia brasileira, observam-se muitas questões não respondidas. Em um *workshop* realizado em Manaus, estado do Amazonas, em 2013, identificou-se como prioridades para a pesquisa desses acidentes: o dimensionamento do agravo nas populações mais vulneráveis; a pesquisa experimental com venenos e revisão do espectro de antivenenos; a determinação das prioridades em pesquisa clínica incluindo reações adversas e farmacovigilância; a capacitação de profissionais; e o levantamento de fauna e captura de animais para produção de antivenenos (10).

1.2. A Serpente *Bothrops atrox* e o Acidente Botrópico

Nas áreas de floresta tropical da Amazônia brasileira são encontradas as seguintes espécies de serpentes do gênero *Bothrops*: *B. atrox, B. bilineatus, B. brazili, B.*

marajoensis e B. taeniatus (8,11). A espécie *Bothrops atrox* é a serpente mais encontrada na Amazônia, sendo a principal causadora dos acidentes botrópicos na região (Figura 3) (10,12). Esta espécie está distribuída por grande parte da América do Sul, exceto no Paraguai, Argentina e Uruguai, ocorrendo predominantemente por toda a Amazônia (13). Trata-se de uma espécie generalista, de coloração críptica, podendo ultrapassar 1,5 m de comprimento (14). Esta espécie pode ser encontrada tanto em área de floresta quanto em áreas de pasto e agricultura, e áreas urbanas. *B. atrox* é uma serpente ativa principalmente durante a noite; o adulto caça preferencialmente no chão, enquanto os juvenis são mais encontrados sobre a vegetação (14,15). Esta serpente é comumente conhecida como jararaca, surucucurana, surucucu, surucucu-do-barranco, boca-podre e comboia (11,16). Isso pode ser um fator de confusão para a identificação da serpente causadora do acidente pela população local uma vez que *B. atrox* e *Lachesis muta* possuem o mesmo nome popular “surucucu” em certas áreas da Amazônia brasileira (10,16).

Figura 3. A serpente *Bothrops atrox*, principal espécie envolvida nos acidentes na Amazônia brasileira. Fonte: http://www.herpetofauna.com.br/FotosSerpentes5.htm

Os acidentes botrópicos caracterizam-se por manifestações clínicas locais, tais como edema, equimose e dor, podendo surgir bolhas com conteúdo seroso, hemorrágico ou necrótico. As marcas da presa no local da picada geralmente são visíveis, assim como o sangramento nos pontos de inoculação das presas. Poucas horas após o acidente pode aparecer linfadenomegalia regional com gânglios aumentados e dolorosos (Figura 4). As principais manifestações sistêmicas são cefaleia, tontura, náuseas, vômitos, alterações da coagulação (tempo de coagulação prolongado ou incoagulabilidade sanguínea) e sangramentos (gengivorragia, hematúria, hemoptise, epistaxe, sangramento conjuntival, hipermenorragia, sangramentos em feridas recentes, equimoses à distância do local da picada, hemorragias digestivas, hematêmese e hemorragia intracraniana), podendo aparecer choque (Figura 5) (12,17–20). As complicações locais mais frequentes incluem infecção secundária (celulite e abscesso), necrose, síndrome compartimental, déficit funcional e amputação (11,17,18). Dentre as complicações sistêmicas surgem a insuficiência renal aguda e septicemia (18,21).

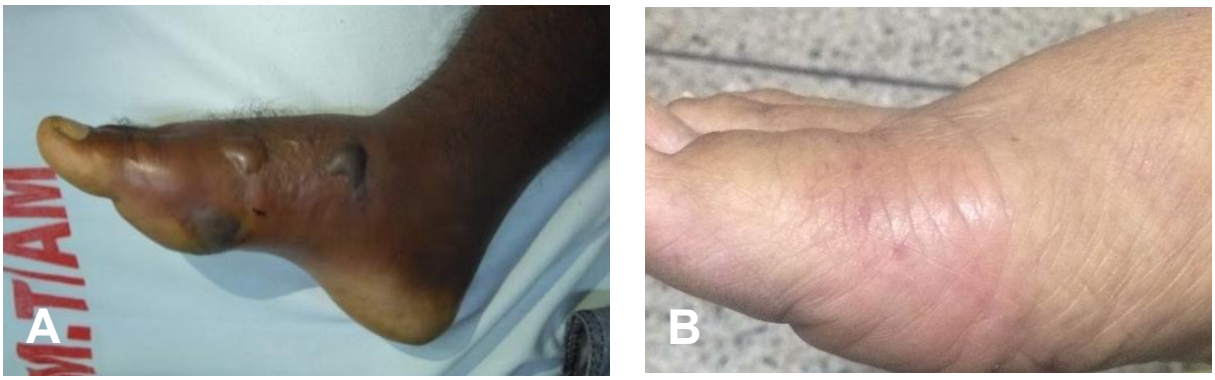


Figura 4. Manifestações locais após acidente botrópico A. Equimose, numerosas bolhas e edema. B. Eritema e marca da presa no local da picada. Foto: Arquivo do Centro de Pesquisa Clínica em Acidentes por Animais (CEPCLAM).

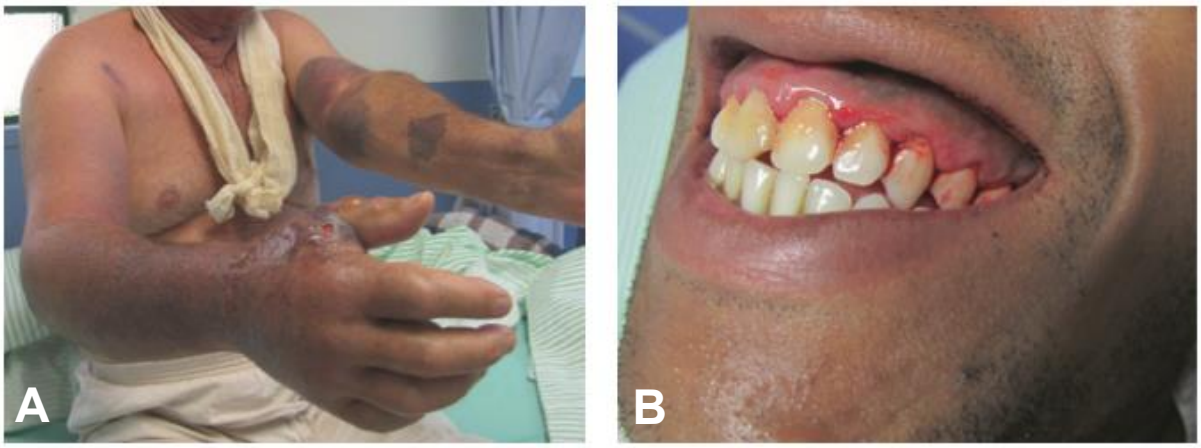


Figura 5. Sangramentos sistêmicos após acidente botrópico. A. A picada foi na mão direita e aparecem equimoses em ambos os braços. B. Sangramento gengival. Fonte: Adaptado de Málaque e Gutiérrez (21).

Os sangramentos sistêmicos, choque, sepse e insuficiência respiratória aguda estão associados com casos fatais de acidentes ofídicos na Amazônia brasileira (7). Casos de hemorragia intracraniana associados com hipertensão arterial e atraso na assistência médica tem sido relatados na região (22,23). Um caso fatal de hemorragia no sistema nervoso central após acidente botrópico relatado em Manaus, estado do Amazonas, associado com hipertensão arterial, que levou 1 hora e 30 minutos para receber assistência médica, mostrou a presença de veneno botrópico no cérebro da vítima (Figuras 6) (24).

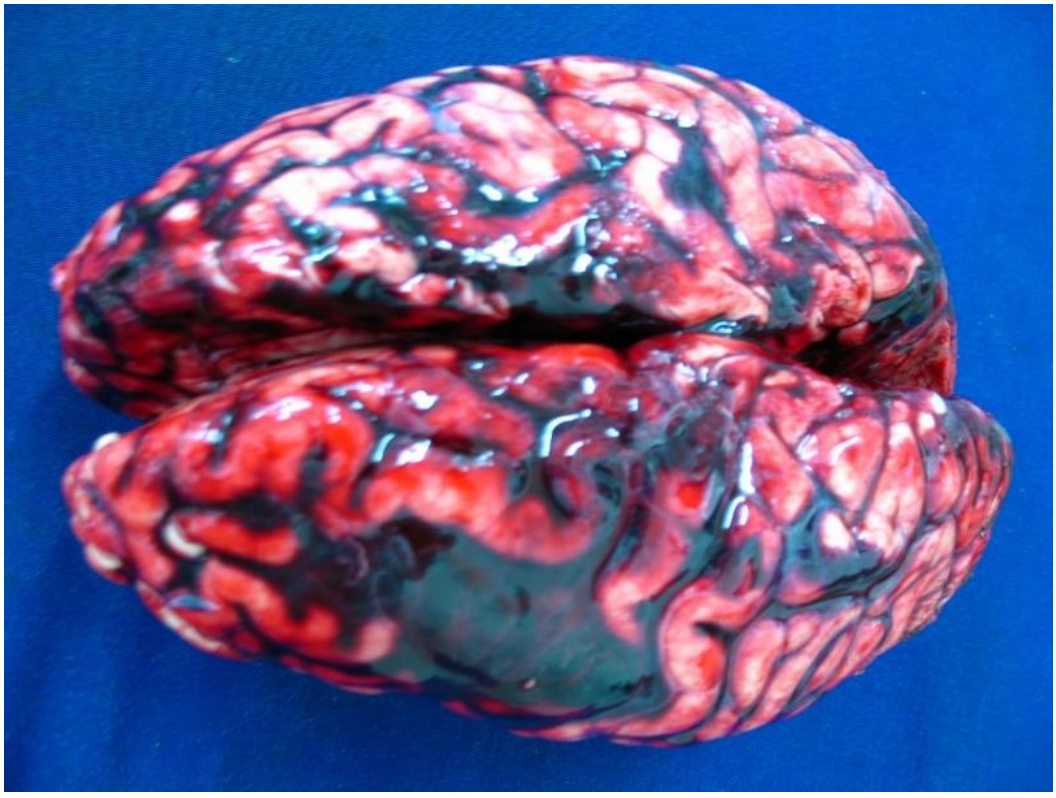


Figura 6. Hemorragia no sistema nervoso central após caso fatal de acidente botrópico em Manaus, Brasil. Fonte: Oliveira et al. (24).

De acordo com as recomendações do Ministério da Saúde para diagnóstico e tratamento do acidentes ofídicos no Brasil, os acidentes botrópicos são classificados quanto à gravidade em: i) casos leves, caracterizados por um quadro clínico local discreto ou ausente, com ou sem sangramento sistêmico e o tempo de coagulação pode estar normal ou alterado; ii) casos moderados, as manifestações locais tornam-se evidentes, envolvendo três a quatro segmentos do membro picado, acompanhado ou não de sangramentos sistêmicos e coagulopatia; iii) casos graves, com edema envolvendo todo o membro picado, geralmente apresentam dor intensa, com ou sem coagulopatia. Sangramento sistêmico grave, choque e/ou insuficiência renal podem estar presentes (20).

A classificação dos casos quanto à gravidade tem como principal objetivo orientar o tratamento específico dos acidentes ofídicos, o qual consiste na administração do antiveneno (25). Assim, o antiveneno é administrado no acidente botrópico em uma dosagem correspondente a gravidade clínica (Quadro 1) (20). Os antivenenos utilizados no Brasil para o tratamento dos acidentes ofídicos consistem em fragmentos

F(ab')$_2$ de imunoglobulinas obtidas pelo fracionamento do plasma de cavalos hiperimunizados com uma mistura de antígenos preparada com venenos de serpentes (26). Nos acidentes botrópicos é administrado o antiveneno botrópico, botrópico-laquético ou botrópico-crotálico (10,20). O antígeno botrópico é formado por mistura de venenos de *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12,5%), *B. moojeni* (12,5%), *B. neuwiedi* (12,5%) e *B. jararacussu* (12,5%) (10). Dessa forma, o veneno de serpentes de importância médica na Amazônia brasileira, como o de *B. atrox*, não está incluso no *pool* de imunização utilizado para a produção dos antivenenos (12,27).

Manifestações e Tratamento	**Classificação**		
	Leve	**Moderada**	**Grave**
Locais • dor • edema • equimose	ausentes ou discretas	evidentes	intensas**
Sistêmicas • hemorragia grave • choque • anúria	ausentes	ausentes	presentes
Tempo de Coagulação (TC)*	normal ou alterado	normal ou alterado	normal ou alterado
Soroterapia (nº ampolas) SAB/SABC/SABL***	2-4	4-8	12
Via de administração	intravenosa		

Quadro 1. Número de frasco-ampolas de antiveneno indicado para acidente botrópico de acordo com a gravidade clínica. Um frasco-ampola contém 10 mL de solução injetável da fração F(ab)$_2$ de imunoglobulina. Um mililitro neutraliza 5 mg do veneno-referência de *B*. *jararaca* (em camundongos) * TC normal: até 10 min; TC prolongado: de 10 a 30 min; TC incoagulável: >30 min. ** Manifestações locais intensas podem ser o único critério para classificação de gravidade. *** SAB = Antiveneno botrópico; SABC = Antiveneno botrópico-crotálico; SABL = Antiveneno botrópico-laquético. Fonte: Brasil - Ministério da Saúde (28).

Alguns estudos sugerem que o antiveneno botrópico não neutraliza efetivamente o veneno de *B. atrox* (29,30), enquanto outros vêm demonstrando que o antiveneno botrópico pode neutralizar o veneno de *B. atrox* (31–33). Já foi

demonstrado em ensaios *in vivo* e *in vitro* que o antiveneno botrópico foi capaz de neutralizar o veneno de serpentes *B. atrox* provenientes de diferentes origens geográficas e tipos de habitat, requerendo, no entanto, volumes distintos de antiveneno para neutralizar dependendo da origem geográfica da serpente e do habitat (30,34). Por outro lado, um estudo clínico envolvendo pacientes com sinais clínicos de envenenamento botrópico, classificados como casos leves e moderados, da região de Belém, estado do Pará, mostrou que os antivenenos *Bothrops-Lachesis* e *B. atrox-Lachesis* foram igualmente eficazes no tratamento desses acidentes (12).

1.3. Os Venenos de Serpentes e a Hemostasia

1.3.1. Hemostasia

A hemostasia é um processo fisiológico que mantém o sangue em um estado fluido enquanto ele circula pelo sistema vascular e impede o sangramento no local de uma lesão através da formação de um tampão hemostático, garantindo a remoção do tampão quando a cicatrização é completa (35–37). Este processo depende do balanço e inter-relações entre os vasos sanguíneos (endotélio vascular), plaquetas, proteínas e inibidores da coagulação, e sistema fibrinolítico. Após a lesão vascular, mecanismos locais produzem vasoconstrição transitória e alteração da permeabilidade vascular com formação de edema. A lesão vascular expõe as proteínas adesivas do subendotélio que estimulam a formação do tampão hemostático através da indução da adesão e agregação plaquetária, e ativação da coagulação do sangue (36).

Com a descontinuidade do endotélio vascular, as plaquetas ligam-se ao colágeno subendotelial através de receptores de superfície (adesão plaquetária). O fator von Willebrand (vWF) funciona como uma ponte entre os receptores da superfície plaquetária glicoproteína Ib (GpIb) e o colágeno exposto. Após a adesão, as plaquetas mudam de forma, emitem pseudópodes e aderem-se umas às outras (agregação plaquetária). O fibrinogênio permite a agregação das plaquetas através da ligação com receptores glicoproteína IIb-IIIa. Juntamente com a mudança da forma ocorre a liberação de compostos biologicamente ativos armazenados nos grânulos plaquetários que reforçam a agregação plaquetária (35).

Simultaneamente, após uma lesão vascular, o fator tissular (FT), uma proteína de membrana expressa em músculo liso, fibroblastos e macrófagos, liga-se ao fator VII ativado (FVIIa) formando o complexo FVIIa/FT. O FVIIa já circula no sangue em sua forma ativada e representa 1% do total de fator VII (36). O complexo FVIIa/FT ativa pequenas quantidades dos fatores IX e X. O fator X ativado (FXa) pode ativar o fator V (FV) (38). O FXa associado com seu cofator, o fator V ativado (FVa), forma o complexo protrombinase na superfície de uma célula que expressa FT. Esse complexo converte pequenas quantidades de fator II (FII) em trombina (FIIa). Essa etapa da coagulação é denominada de fase de iniciação (Figura 7) (39,40).

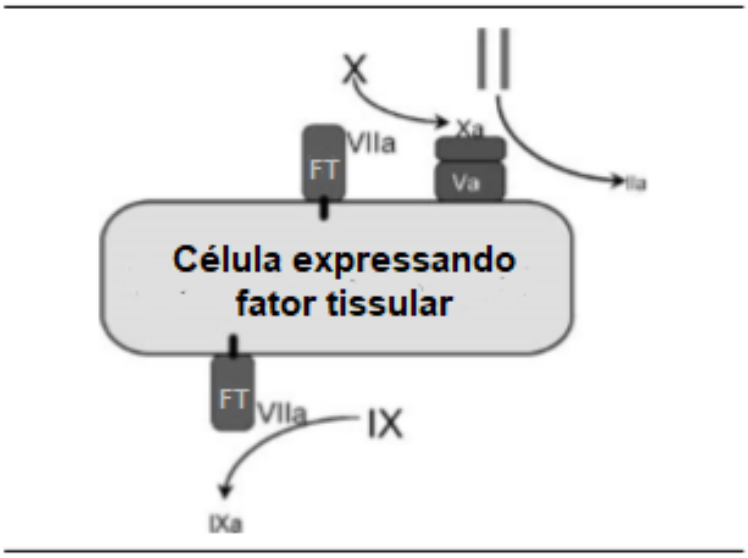


Figura 7. Fase de iniciação da coagulação. Esta fase da coagulação ocorre sobre células que expressam fator tissular. F: fator de coagulação; a: ativado. Fonte: Adaptado de Hoffman (37).

A pequena quantidade de trombina gerada na superfície de células que expressam FT se liga aos receptores de superfície plaquetária causando mudança de forma das plaquetas, deslocamentos dos fosfolipídeos da membrana para criar uma superfície de membrana procoagulante (expõe receptores e sítios de ligação para fatores de coagulação ativados) e liberação do conteúdo dos grânulos. Outra função da trombina formada durante a fase de iniciação é a ativação de cofatores FV e fator VIII (FVIII) na superfície das plaquetas ativadas (41). A trombina também dissocia o FvW ligado ao FVIII, permitindo o FvW mediar a adesão e agregação plaquetárias no

local da lesão. Além disso, a trombina gerada também ativa fator XI (FXI) em FXIa sobre a superfície plaquetária. Essa etapa da coagulação é denominada de fase de amplificação (Figura 7) (37).

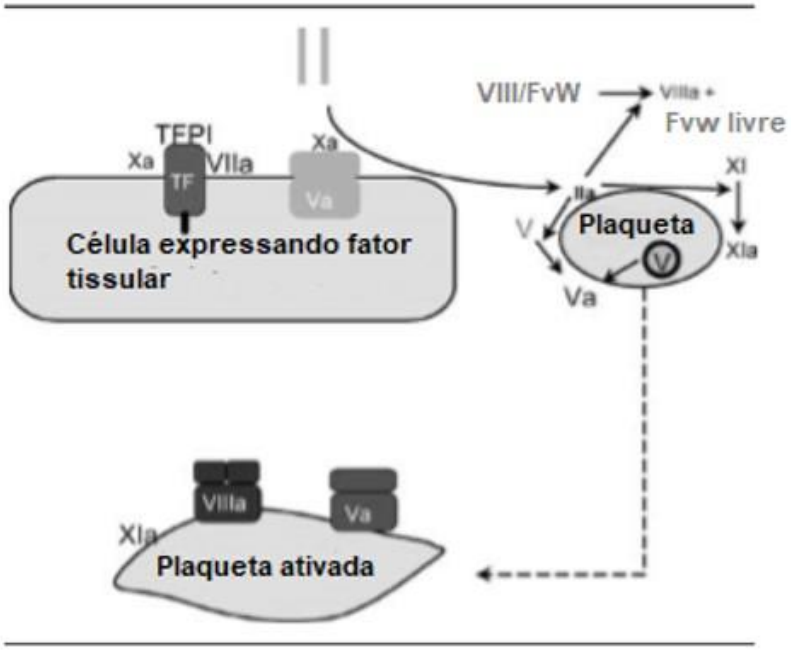


Figura 8. Fase de amplificação da coagulação. Esta fase da coagulação ocorre sobre a plaqueta quando ela é ativada. a: ativado. Fonte: Adaptado de Hoffman (37).

Uma vez que algumas plaquetas são ativadas na fase de amplificação, a liberação do conteúdo dos grânulos resulta no recrutamento de plaquetas adicionais para o local da lesão. A exposição de receptores glicoproteínas na superfície das plaquetas permite a agregação plaquetária. Essa nova etapa da coagulação é denominada de fase de propagação e ocorre sobre a superfície plaquetária. Assim, o FIXa gerado pelo complexo FVIIa/FT durante a fase de iniciação pode se ligar ao FVIIIa na superfície das plaquetas formando o complexo tenase. Além disso, quantidades adicionais de FIXa podem ser geradas pelo FXIa ativado durante a fase de amplificação. O complexo fator VIIIa/IXa ativa fator X que juntamente com o FVa formam o complexo protrombinase. O FXa, juntamente com o seu cofator FVa, cliva o FII em trombina. A trombina gerada converte o fibrinogênio em fibrina e também ativa o fator XIII em fator XIIIa, para formar um coágulo de fibrina estável (Figure 7) (37,39,41). O processo de coagulação é regulado por numerosas proteínas inibitórias,

que atuam como anticoagulantes naturais, evitando a oclusão trombótica, como: o inibidor da via do fator tissular (TFPI), que atua inibindo o complexo FVIIa/FT; a proteína C, em combinação com a proteína S, que degradam o FVa e FVIIIa; e a antitrombina III, que inibe a trombina, FIXa e FXa (36,37).

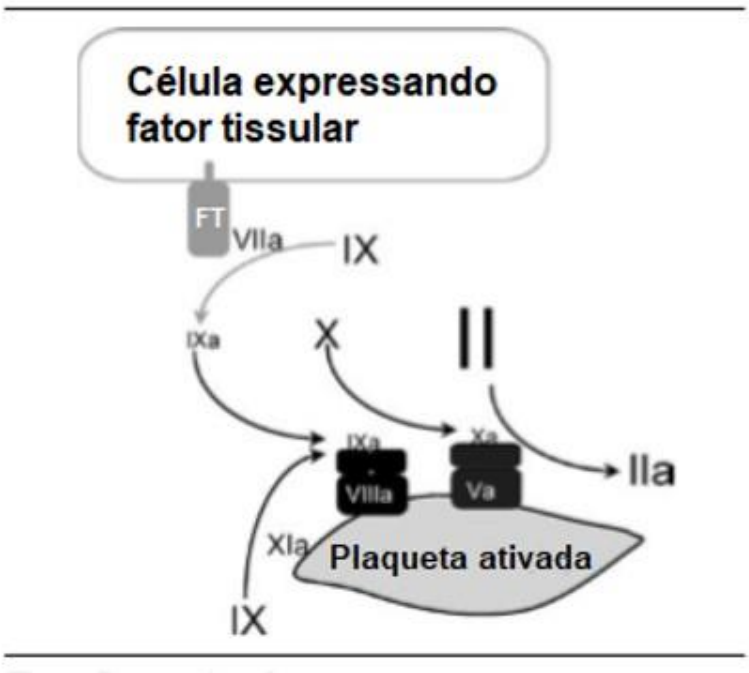


Figura 9. Fase de propagação da coagulação. Esta fase da coagulação ocorre sobre a superfície de plaquetas ativadas. F: fator de coagulação; a: ativado. Fonte: Adaptado de Hoffman (37).

A fibrinólise remove a fibrina formada em excesso garantindo a fluidez sanguínea. O plasminogênio, uma proteína precursora inativa, é convertido em plasmina, uma enzima ativa, por dois ativadores: o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). A plasmina degrada a fibrina, quer seja polimerizada ou não, formando os produtos de degradação da fibrina (PDFs). Também é capaz de degradar o fibrinogênio, FV e FVIII. A inibição da fibrinólise ocorre em nível dos ativadores do plasminogênio mediante ação de inibidores específicos (PAIs, “plasminogen activator inhibitors”), cujo principal representante é o PAI-1, e diretamente sobre a plasmina, função inibitória exercida pela alfa 2-antiplasmina (36).

1.3.2. A Ação do Veneno de *Bothrops atrox* sobre a Hemostasia

Os venenos de serpentes são complexas misturas de proteínas e peptídeos, os quais constituem 90% do peso seco do veneno (42). Eles são usados para imobilizar, paralisar, matar e auxiliar na digestão da presa, e como defesa contra os possíveis predadores (43). Algumas dessas toxinas possuem diversas atividades enzimáticas enquanto outras são proteínas não-enzimáticas (44). O aparecimento de distúrbios hemostáticos nos acidentes ofídicos é induzido por uma complexa mistura de componentes presentes nos venenos de serpentes como metaloproteases, serinoproteases, 5'-nucleotidases, fosfolipases A_2, L-aminoácido oxidases, disintegrinas, lectinas tipo-C e toxinas "three-finger" (45). Os componentes dos venenos podem ser classificados de acordo com as atividades que exercem sobre o sistema hemostático em: coagulantes e anticoagulantes (quando atuam na coagulação), agregantes e antiagregantes plaquetários (que agem sobre as plaquetas) e fatores hemorrágicos (quando causam lesão vascular) (Tabela 1) (46).

Tabela 1. Proteínas de venenos de serpentes que atuam sobre o sistema hemostático.

Família de Proteína	**Alvo no Sistema Hemostático**	**Efeito**
Serinoproteases	Plaquetas	Agregação
	FX, FVII, FV, FII, PC	Ativação
	Plasminogênio	Ativação
	Fibrinogênio	Coagulante
	Fibrina(ogênio)	Degradação
	Serpinas	Inativação
Metaloproteases	Células endoteliais, membrana basal	Hemorragia
	Plaquetas	Inibição da agregação
	FX, FII	Ativação
	Fibrina(ogênio)	Degradação
	Serpinas	Inativação
Fosfolipases A_2	FXa, FIIa, FVII/TF	Inibição
	Plaquetas	Agregação
		Inibição da agregação

Cont. Tabela 1.

L-aminoácido oxidases	Células endoteliais	Hemorragia
	Plaquetas	Agregação
		Inibição da agregação
Nucleotidases	Plaquetas	Inibição da agregação
Desintegrinas	Plaquetas	Inibição da agregação
Lectinas tipo-C	FIX, FX, trombina	Inibição
	FX, FII	Ativação
	Plaquetas	Agregação
		Inibição da agregação
Toxinas “three-finger	FVIIa	Inibição
	Plaquetas	Inibição da agregação

Abreviações usadas: F: fator de coagulação; PC: proteína C. Fonte: Adaptado de Sajevic et al. (45).

Em geral, o veneno de serpentes do gênero *Bothrops* possui ação direta sobre o fibrinogênio, convertendo-o em fibrina, ativa FX, FII e plaquetas, e causa lesão no endotélio vascular (47,48). Os venenos de serpentes com ação coagulante geralmente causam incoagulabilidade sanguínea, resultante do consumo de fibrinogênio e alguns fatores de coagulação (49). A associação da ação coagulante do veneno de *Bothrops* com sua atividade sobre as plaquetas e endotélio vascular poderia levar a uma maior incidência de sangramentos sistêmicos nas vítimas de acidentes ofídicos (48).

O veneno de *B. atrox* possui componentes com atividade trombina-símile, que hidrolisam diretamente o fibrinogênio em fibrina (50–52), e pró-coagulantes, que ativam FII e FX, resultando na formação de trombina endógena (53,54). Outros fatores de coagulação ativados por componentes isolados do veneno de *B. atrox* são FXIII e FV (55,56). Além desses, uma metaloprotease da classe PI, denominada batroxase, que apresenta atividade fibrino(geno)lítica, trombolítica e induz fraca hemorragia através da digestão de componentes da matriz extracelular como laminina, colágeno tipo IV e fibronectina, foi isolada do veneno de *B. atrox* (Figura 8) (57,58).

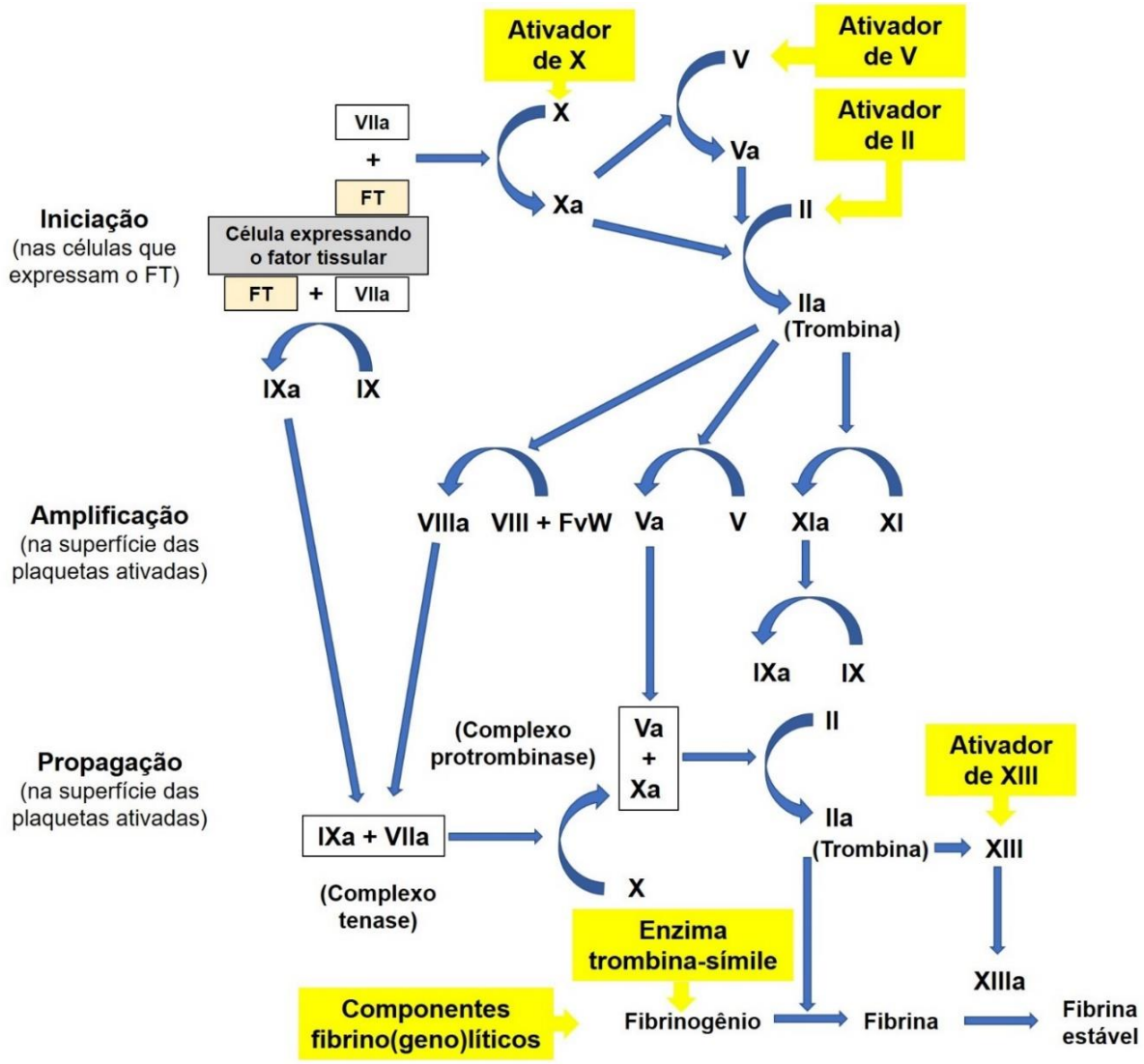


Figura 10. A ação do veneno de serpentes *Bothrops atrox* sobre a coagulação. FT: fator tissular; a: ativado. Fonte: Adaptado de Ferreira et al. (40)

Componentes que atuam sobre as plaquetas também foram isolados do veneno de *B. atrox* como a trombocitina, uma serinoprotease que causa agregação plaquetária e liberação de alguns constituintes das plaquetas (55), a batroxostatina, um peptídeo que inibe a agregação plaquetária induzida por adenosina difosfato (ADP) (59), a botrocetina, uma proteína com atividade aglutinante plaquetária dependente do FvW (60) e a batroxrragina, uma metaloprotease da classe PIII que inibe a agregação plaquetária induzida pelo colágeno, induz forte hemorragia e hidrolisa fibrina de forma dose dependente (61). Além desses, outros componentes que causam lesão vascular induzindo hemorragias foram isoladas do veneno de *B. atrox* como a atroxlysin-Ia, uma metaloprotease da classe PI que induz forte

hemorragia, de forma similar a batroxrragina (62), a Batx-I, uma metaloprotease da classe PI que induz fraca atividade hemorrágica e leve mionecrose (63), e a HI-5, uma metaloprotease da classe PI que também induz fraca atividade hemorrágica (64)

Em vítimas de acidentes por serpentes *B. atrox* em Belém, na Amazônia brasileira, foram observados distúrbios na coagulação, tais como hipofibrinogenemia, ativação do sistema fibrinolítico e geração de trombina intravascular. Aproximadamente 10% dos acidentados apresentaram trombocitopenia, ou seja, número de plaquetas abaixo de $150x10^9$/L, e 18% desenvolveram sangramentos sistêmicos (12). Por outro lado, experimentalmente não foi observado no veneno bruto de *B. atrox* atividade agregante sobre plaquetas lavadas de coelhos (65).

A variabilidade na composição e atividades biológicas dos venenos de serpentes tem sido reportada não somente entre diferentes espécies de serpentes (variação interespecífica) como também dentro de uma mesma espécie (variação intraespecífica) (66). Contudo, a variabilidade dos venenos de serpente é principalmente relacionada ao nível de expressão de cada família de toxinas do que com a presença ou ausência das principais famílias de toxinas (31,67). Os estudos realizados com o veneno de serpentes *B. atrox* demonstram variabilidade em sua composição e atividades biológicas a depender do estágio ontogenético (68), da origem geográfica (30,33,67,69) e do habitat da serpente (34). Diferenças têm sido observadas nas atividades coagulante e hemorrágica do veneno de *B. atrox* de áreas distintas da Amazônia brasileira (Presidente Figueiredo, Amazonas; Belterra, Pará; e São Bento, Maranhão) (33). O veneno de *B. atrox* capturada em área de várzea no Oeste do Pará induz atividade hemorrágica menor e é mais coagulante do que venenos de *B. atrox* provenientes de áreas degradadas, de floresta e de pasto (34). Além disso, a atividade coagulante de veneno de serpentes *B. atrox* juvenis é maior do que de adultas (68).

1.4. Relevância

Um estudo mais detalhado sobre os distúrbios hemostáticos observados em vítimas de acidentes botrópicos ocorridos na Amazônia brasileira ajudará a identificar os fatores associados ao aparecimento desses distúrbios e entender melhor o

mecanismo de ação do veneno sobre a hemostasia, ainda pouco conhecido. Além disso, o veneno de *B. atrox*, principal serpente causadora de acidentes ofídicos na Amazônia brasileira, não é utilizado na produção do antiveneno administrado no tratamento dos acidentes botrópicos. Dessa forma, a variabilidade na composição e atividades biológicas observada entre o veneno de diferentes espécies de serpentes e dentro de uma mesma espécie, a depender da origem geográfica, sexo, habitat e estágio ontogenético da serpente, poderia repercutir na recuperação dos distúrbios hemostáticos presentes nas vítimas de acidentes botrópicos na Amazônia brasileira após a administração do antiveneno, assim como na gravidade das manifestações clínicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar a epidemiologia e patogênese dos distúrbios hemostáticos nos acidentes botrópicos.

2.2. Específicos

1. Verificar a frequência de sangramentos sistêmicos e seus fatores associados.

2. Investigar as mudanças nos níveis de fatores de coagulação e contagem plaquetária após o acidente botrópico.

3. Avaliar a recuperação da incoagulabidade sanguínea, fatores de coagulação, trombocitopenia e sangramentos sistêmicos após a administração do antiveneno.

3. PRODUTO DA TESE

3.1. Manuscrito científico 1 (redigido conforme normas da revista *Toxins*, na qual foi publicado):

Article

Factors associated with systemic bleeding in *Bothrops* envenomation in a tertiary hospital in the Brazilian Amazon

Sâmella S. Oliveira [1,2], Eliane C. Alves [1,2], Alessandra S. Santos [2], João Pedro T. Pereira [2], Lybia Kássia S. Sarraff [2], Elizandra F. Nascimento [2], José Diego de-Brito-Sousa [1,2], Vanderson S. Sampaio [1,2], Marcus V.G. Lacerda [2], Jacqueline A.G. Sachett [1,2], Ida S. Sano-Martins [3,†] and Wuelton M. Monteiro [1,2,*,†]

1. Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus 69065-001, Brazil; oliveira.samella@gmail.com (S.S.O.); anealves.enf@gmail.com (E.C.A.); sousajdb@live.com (J.D.d.-B.-S.); vandersons@gmail.com (V.S.S.); jac.sachett@gmail.com (J.A.G.S.)
2. Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus 69040-000, Brazil; alessandrasantos910@gmail.com (A.S.S.); pedro02.tavares@gmail.com (J.P.T.P.); lybsarraff@gmail.com (L.K.S.S.); elyfreitas46@gmail.com (E.F.N.); marcuslacerda.br@gmail.com (M.V.G.L.)
3. Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo 05503-900, Brazil; ida.sano@butantan.gov.br

* Correspondence: wueltonmm@gmail.com; Tel.: +55-922-127-3555

These authors contributed equally to this work.

Received: 11 November 2018; Accepted: 20 December 2018; Published: 7 January 2019

Abstract: *Bothrops* snakebites usually present systemic bleeding, and the clinicalepidemiological and laboratorial factors associated with the development of this manifestation are not well established. In this study, we assessed the prevalence of *Bothrops* snakebites with systemic bleeding reported at the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado*, in Manaus, Amazonas State, Brazil, and the clinical-epidemiological and laboratorial factors associated with systemic bleeding. This is an observational, cross-sectional study carried out between August, 2013 and July, 2016. Patients who developed systemic bleeding on admission or during hospitalization were considered cases and those with non-systemic bleeding were included in the control group. Systemic bleeding was observed in 63 (15.3%) of the 442 *Bothrops* snakebites evaluated. *Bothrops* snakebites mostly occurred in males (78.2%), in rural areas (89.0%) and in the age group of 11 to 30 years old (40.4%). It took most of the patients (59.8%) took less than 3 h to receive medical assistance. Unclottable blood [AOR=3.11 (95% CI=1.53 to 6.31; p=0.002)] and thrombocytopenia (AOR=4.52 (95% CI=2.03 to 10.09; p<0.001)) on admission were independently associated with systemic bleeding during hospitalization. These hemostatic disorders on admission increase the chances of systemic bleeding during hospitalization. Prospective studies are needed to clarify the pathophysiology of systemic bleeding in *Bothrops* snakebites in the Amazon region.

Keywords: Hemostatic disorders; unclottable blood; thrombocytopenia; *Bothrops atrox.*

Key Contribution: Systemic bleeding observed after *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon is an important systemic effect of the envenomation. Thrombocytopenia and unclottable blood on admission are factors associated with systemic bleeding during hospitalization.

1. Introduction

Snakebite envenomation is a potentially life-threatening injury and a major public health problem in rural areas of tropical and sub-tropical countries of Africa, the Middle-East, Asia, Oceania and Latin America. Global estimates suggest that at least 400,000 snakebites occur annually, which result in 20,000 deaths [1]. In Brazil, approximately 25,000 snakebites of medical importance are reported each year, with an average lethality rate of 0.4% [2]. The Amazon region reports the highest incidence of snakebite envenomation in Brazil, with 52.6 cases/100,000 inhabitants [3]. In the Amazonas State, an incidence rate of 52.8 cases/100,000 inhabitants and a 0.6% lethality rate can be observed [4]. Injuries occurring at a distance >300 Km from Manaus, the Amazonas State capital, the age of the victim ≥61 years, and indigenous status were factors that were independently associated with case fatality from snakebites [5]. The *Bothrops* genus is responsible for the highest frequency of snakebites in the Brazilian Amazon, causing 80% to 90% of the cases in the region [6]. *Bothrops atrox* is the main species of snake involved in these snakebites [6,7]. *Bothrops* snakebite victims usually present local symptoms (i.e. pain, swelling, ecchymosis and blistering) and systemic manifestations such as bleeding and coagulation disorders [7–9]. Complications such as necrosis, secondary bacterial infection, compartment syndrome and acute renal failure may also occur [8]. Although cases of death are rare, they are frequently associated with renal and respiratory failure, shock, sepsis, and hemorrhage in the central nervous system [9]. In fatal cases of *Bothrops* snakebites in the Amazonas State, systemic bleeding, circulatory shock, sepsis and acute respiratory failure were usually observed [5]. One case of fatal hemorrhagic stroke after a *Bothrops* snakebite in the Amazonas State, in which the presence of venom in the patient's brain tissue was identified after death, has been reported. The victim received *Bothrops* antivenom two and a half hours after the bite [10].

Clinical manifestations observed in *Bothrops* snakebites appear as result of the action of the snake venom [11]. The components that are most abundant in *B. atrox* venom are snake venom metalloproteinases (SVMPs), snake venom serine proteinases (SVSPs), and phospholipases A_2 (PLA_2) [12]. These components of the snake venom can affect hemostasis by activating or inhibiting coagulant factors or platelets, or by disrupting endothelium or by causing thrombosis [13,14]. The

association of the coagulant action of venom with its activity on platelets and vascular endothelium could lead to a higher incidence of systemic bleeding as a result of the snakebite [15]. Hemodynamic changes, which may result in cardiovascular shock, may occur as a consequence of systemic bleeding [16]. However, the composition and biological activities of snake venoms may vary, not only between different species of snakes (interspecific variation), but also within the same species (intraspecific variation) depending on the geographical origin, ontogenetic stage, habitat, or sex of the snake, thus influencing the clinical manifestations of snakebites [17,18].

It has been observed that between 7% and 53% of *Bothrops* snakebites develop systemic bleeding [7,15,19–21]. It is not clear why some *Bothrops* snakebites patients develop systemic bleeding and others do not. A better understanding of the development of systemic bleeding in patients who have suffered *Bothrops* snakebite would lead to improved management and understanding of the pathophysiology of envenomation of snakes that have medical importance in the Brazilian Amazon. Thus, the aim of this study was to assess the prevalence of *Bothrops* snakebites in which systemic bleeding was reported at a specialist hospital for snakebites in Manaus, Amazonas State, and the clinical-epidemiological and laboratorial factors associated with systemic bleeding in victims of envenomation by *Bothrops* snakes. The results show that systemic bleeding observed in *Bothrops* snakebite patients is an important systemic effect of the envenoming. Thrombocytopenia and unclottable blood detected on admission are factors associated with systemic bleeding during hospitalization. Moreover, the effect of other parameters, such as some toxins components of the venom, cannot be ruled out.

2. Results

2.1. Study Population

A total of 553 patients with clinical-epidemiological diagnosis of *Bothrops* envenomation were assessed for eligibility over the three year study period. From this total, 412 were eligible for inclusion in our study (Figure 1). The majority of *Bothrops* envenomations were in males (78.2%) and in the age group of 11 to 30 years old (40.4%). These snakebites mostly occurred in Manaus (57.4%), Amazonas State

capital, in rural areas (89.0%) and only 39.8% were related to work. The majority of patients (59.8%) took less than 3 hours to reach medical assistance. The most affected anatomical site was the foot (72.1%). The *Bothrops* bite was confirmed by snake identification in 32.8% of the included patients' records. All *Bothrops* snakes were identified as being *Bothrops atrox* (Table 1).

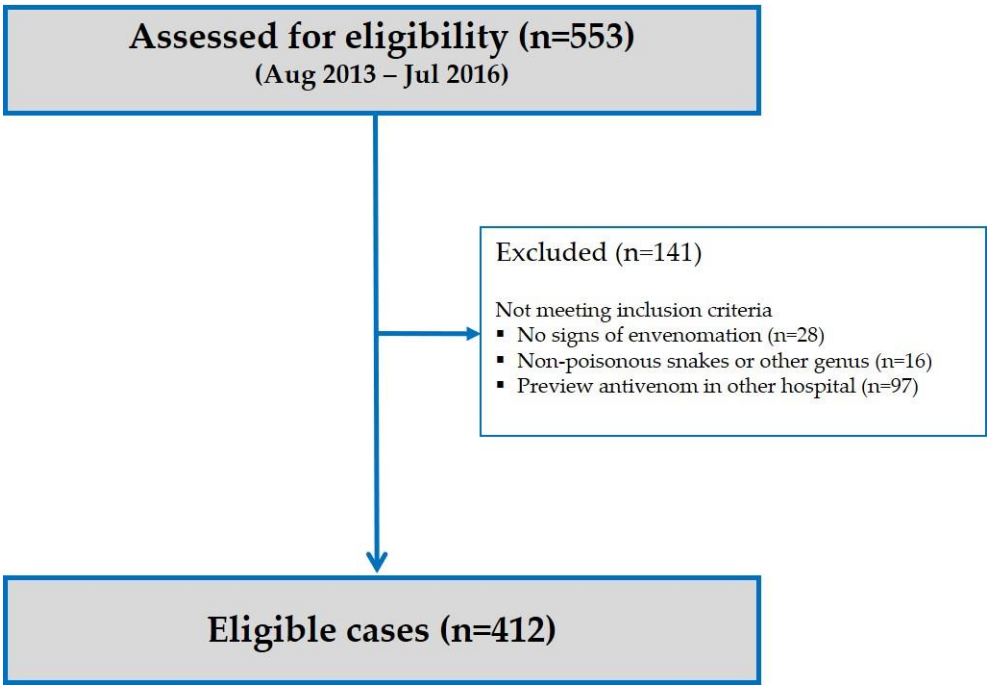


Figure 1. Flow chart for the inclusion of patient with clinical-epidemiological diagnosis of *Bothrops* envenomation in our study.

Table 1. Background information of *Bothrops* snakebite patients obtained on admission.

Characteristics (n; completeness)	**Number**	**%**
Gender (n=412; 100%)		
Male:female	322:90	
Age group in years (n=412; 100%)		
0-10	41	10.0
11-20	83	20.2
21-30	83	20.2
31-40	60	14.6
41-50	54	13.1
51-60	51	12.4

>60	40	9.7
Geographic location of the snakebite incident (n=411; 99.76%)		
Capital (municipality of Manaus)	236	57.4
Municipalities of the interior of the Amazonas State	171	41.6
Other States	4	1.0
Area of occurrence (n=410; 99.52%)		
Rural	365	89.0
Urban	45	11.0
Work-related bite (n=332; 80.58%)		
Yes	132	39.8
Occupation (n=171; 41.51%)		
Rural worker	85	49.7
Other	86	50.3
Time-taken to reach to medical assistance (hour) (n=410; 99.52%)		
0-3	245	59.8
4-6	85	20.7
>6	80	19.5
Anatomical location of bite (n=412; 100%)		
Foot	297	72.1
Lower Leg	59	14.3
Thigh	4	1.0
Hand	49	11.9
Arm	3	0.7
Pre-hospital treatment		
Tourniquets (n=314; 76.21%)	56	17.8
Local incisions (n=313; 75.97%)	17	5.4
Use of topical/oral medicines (n=314; 76.21%)	167	53.2
***Bothrops* bite confirmation (n=412; 100.0%)**		
Confirmed by snake identification	135	32.8
Clinical-epidemiological diagnosis	277	67.2

Clinical characterization of *Bothrops* snakebite patients on admission showed that the most frequent local manifestations were pain (93.9%) followed by swelling (93.4%). Among the systemic alterations related to hemostasis, unclottable blood (58.2%), bleeding (12.6%), and thrombocytopenia (8.7%) were observed. Other common systemic manifestations were headache (11.4%), nausea (10.7%), and vomiting (9.7%). Most cases were moderate (54.2%), followed by mild (27.7%) cases. Comorbidities such as arterial hypertension (9.3%) and diabetes (2.6%) were also observed. There were no recorded deaths due to a snakebite in this study period (Table 2).

Table 2. Clinical characteristics and comorbidities of *Bothrops* snakebite patients obtained on admission.

Variable	Number	%
Local manifestations (n=412; 100%)		
Pain	385	93.9
Swelling	382	93.4
Bleeding from fang punctures	120	29.3
Redness	120	29.1
Ecchymosis	36	8.7
Paresthesia	35	8.5
Haematoma	8	1.9
Blistering	7	1.7
Regional lymphadenopathy	4	1.0
Systemic alterations related to hemostasis		
Unclottable blood (n=386; 93.69%)	224	58.2
Bleeding (n=412; 100%)	52	12.6
Trombocytopenia (n=379; 91.99%)	33	8.7
Other systemic manifestations (n=412; 100%)		
Headache	47	11.4
Nausea	44	10.7
Vomiting	40	9.7
Blurred vision	14	3.4
Abdominal pain	7	1.7

Diarrhoea	5	1.2
Clinical severity of envenomation (n=404; 98.06%)		
Mild	112	27.7
Moderate	219	54.2
Severe	73	18.1
Comorbidities (n=313; 75.97%)		
Arterial hypertension	29	9.3
Diabetes	8	2.6
Hepatopathy	4	1.3
Cardiopathy	3	1.0
HIV/Aids	1	0.3
Time spent in hospital (days)		
Mean (range) (n=405, 98.30%)	7	(1-41)
Outcome (n=411; 99.76%)		
Discharged	411	100.0

2.2. Hemostasis parameters

Systemic bleeding was observed during hospitalization in 15.3% of the *Bothrops* snakebite patients. Conjunctival bleeding was the most frequent form of systemic bleeding (6.7%), followed by gingival bleeding (6.3%) (Table 3). The majority of the *Bothrops* snakebite patients with systemic bleeding during hospitalization showed a platelet count on admission that was higher than 150,000/µL, irrespective of the type of systemic bleeding, except for one patient who presented petechiae (<50,000/µL) (Table 4).

Table 3. Systemic bleeding of *Bothrops* snakebite patients during hospitalization.

Description	**Number**	**%**
Systemic bleeding (n=412; 100%)	63	15.3
Conjunctival	27	6.7
Gingival	26	6.3
Macrohematuria	18	4.4
Haematemesis	12	2.9

Haemoptysis	10	2.4
Epistaxis	10	2.4
Ecchymosis	7	1.7
Enterorrhage	5	1.2
Metrorrhagia	3	0.7
Petechiae	1	0.2
From recent wound	1	0.2

Table 4. Systemic bleeding of *Bothrops* snakebite patients during hospitalization versus platelet count on admission.

	Platelet count		
	<50 x10³/µL	**50-150 x10³/µL**	**>150 x10³/µL**
	***n* (%)**	***n* (%)**	***n* (%)**
Systemic bleeding (n=55; 100%)	5 (9.1)	8 (14.5)	42 (76.4)
Conjunctival	0 (0.0)	2 (8.3)	22 (91.7)
Gingival	2 (8.3)	4 (16.7)	18 (75.0)
Macrohematuria	1 (6.3)	4 (25.0)	11 (68.7)
Haematemesis	2 (20.0)	2 (20.0)	6 (60.0)
Haemoptysis	1 (11.1)	3 (33.3)	5 (55.6)
Epistaxis	0 (0.0)	1 (11.1)	8 (88.9)
Ecchymosis	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (100.0)
Enterorrhage	0 (0.0)	1 (25.0)	3 (75.0)
Metrorrhagia	0 (0.0)	1 (33.3)	2 (66.7)
Petechiae	1 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
From recent wound	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (100.0)

Median platelet count on admission of *Bothrops* snakebite patients with (217,000/µL) and without (239,500/µL) systemic bleeding during hospitalization showed significant statistical differences ($p=0.035$) (Figure 2). Negative (inverse) correlation was found between the variables of number of platelets and mean platelet volume on admission ($r= -0.463$; $p<0.001$) for absolute values during testing (Figure 3).

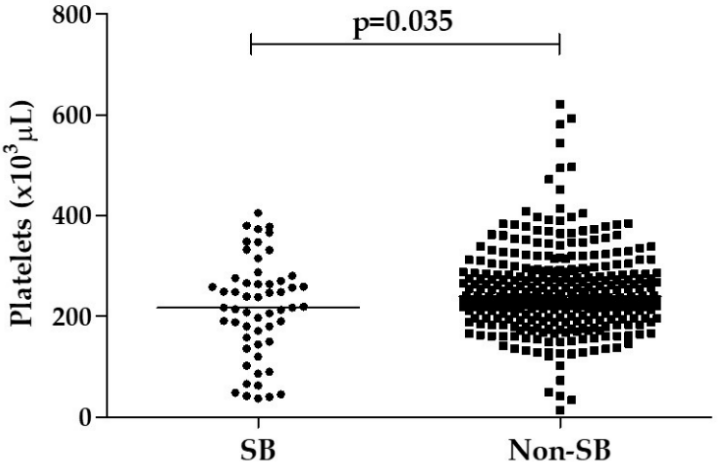


Figure 2. Platelet counts obtained on admission for *Bothrops* snakebite patients that showed systemic bleeding (SB) or not (Non-SB) during hospitalization.

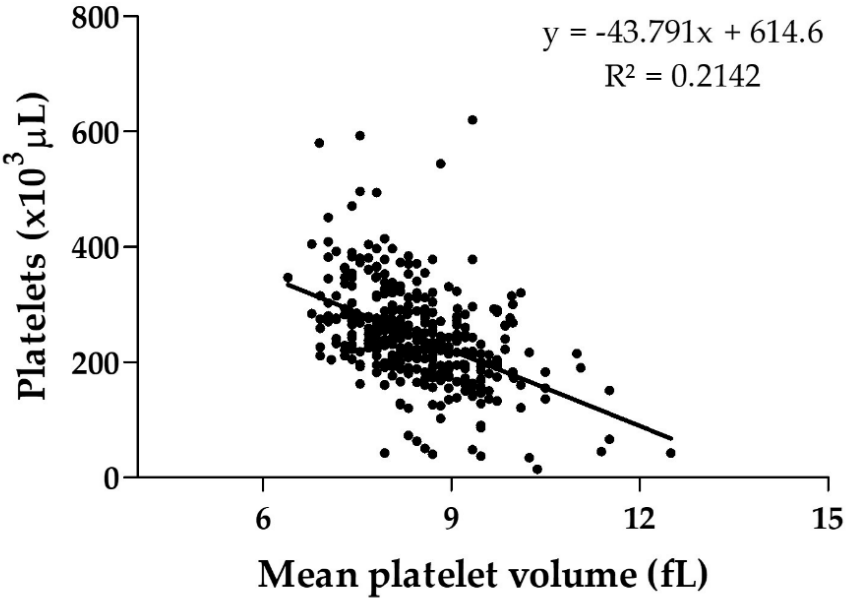


Figure 3. Platelet counts and mean platelet volume obtained on admission for *Bothrops* snakebite patients. Pearson correlation coeficiente (r) between the variables was equivalent to -0.463 ($p < 0.001$).

The area under the Receiver operating characteristics (ROC) curve showed that platelet counts obtained on admission presented a poor ability for discriminating

Bothrops snakebite patients with systemic bleeding during hospitalization (AUROC = 0.6133; 95% CI =0.531 to 0.696; p=0.007) (Figure 4).

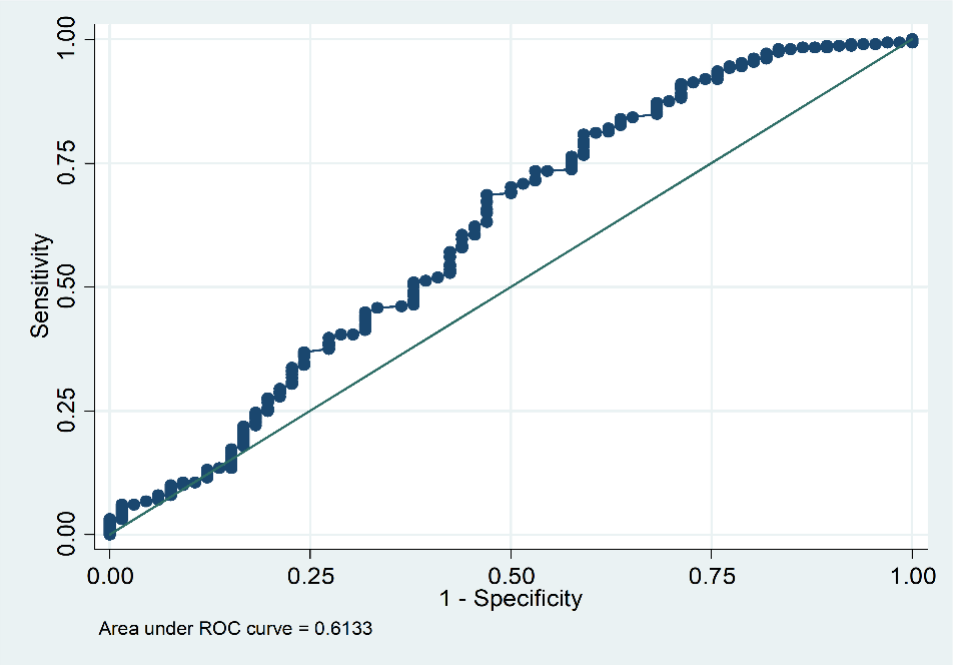


Figure 4. Receiver operating characteristics (ROC) curve depicting the discriminatory performance of the platelet count obtained on admission (AUROC=0.6133; 95% CI= 0.531 to 0.696; p=0.007) for systemic bleeding during hospitalization in *Bothrops* snakebite patients. AUROC, area under ROC curve; continuous line: Reference.

Systemic bleeding and unclottable blood presented an improvement within 24 hours in most patients after administration of the specific antivenom, while the frequency of thrombocytopenia increased in the first 48 hours after antivenom administration, though it did decrease on discharge, and the frequency of abnormal mean platelet volume showed a decrease until discharge. (Figure 5). No bleeding episode was recorded in patients who returned for clinical reassessment after being discharged.

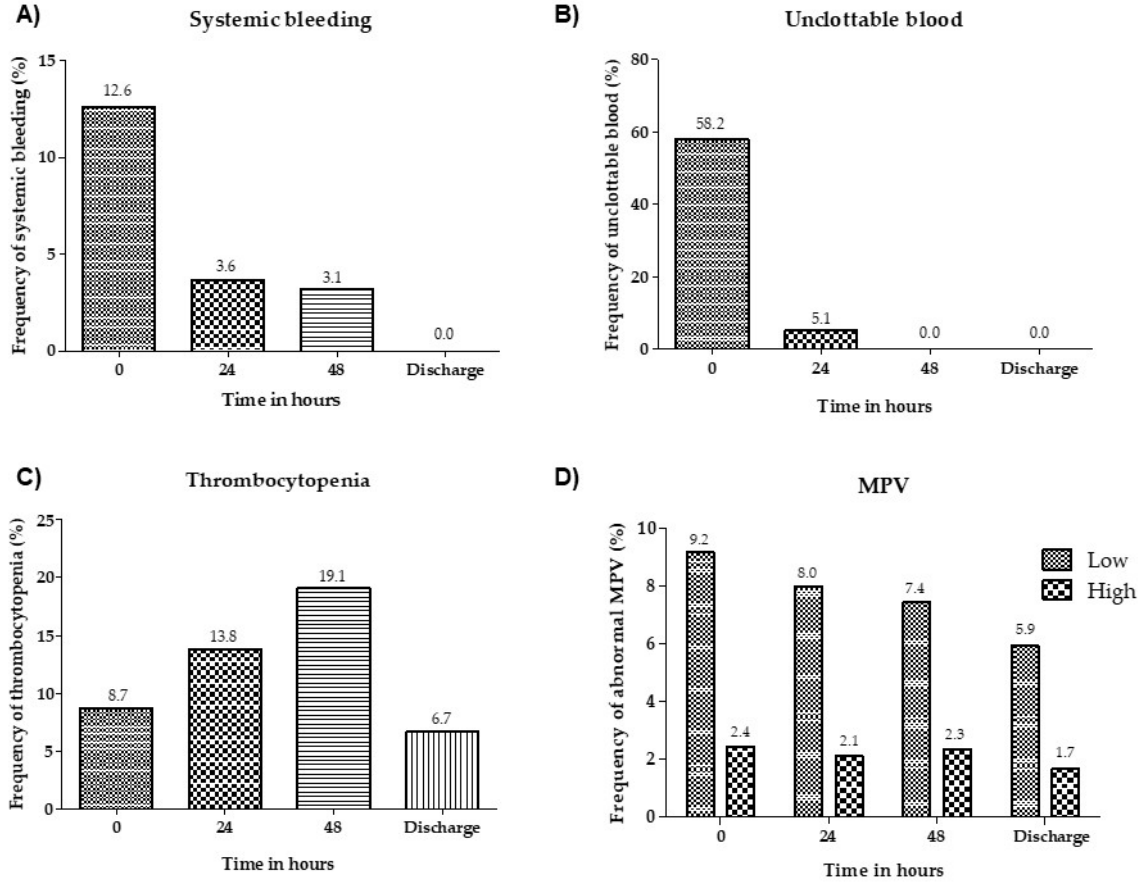


Figure 5. Frequency of systemic bleeding (A), unclottable blood (B), thrombocytopenia (platelet count <150,000/µL) (C) and abnormal mean platelet volume, low (<7.4fL) and high (>10.4 fL) (D) on admission, 24 h and 48 h after administration of the specific antivenom and on discharge. MPV: Mean platelet volume.

2.3. Factors associated with systemic bleeding

A total of 63 *Bothrops* snakebite patients with systemic bleeding during hospitalization were included as cases and 349 *Bothrops* snakebite patients with non-systemic bleeding were included as controls. Unclottable blood (AOR=3.11 (95%CI=1.53 to 6.31; p=0.002)) and thrombocytopenia (AOR=4.52 (95%CI=2.03 to 10.09; p<0.001)) on admission were independently associated with the risk of developing systemic bleeding after a *Bothrops* snakebite during hospitalization (Table 5).

Table 5. Parameters obtained on admission associated with systemic bleeding (SB) of *Bothrops* snakebite patients during hospitalization.

Description	SB (*n*)	%	Non-SB (*n*)	%	Crude OR (IC 95%)	p	Adjusted OR (IC 95%)	p
Sex								
Female	15	16.7	75	83.3	0.88 (0.46-1.65)	0.682	…	…
Male	48	14.9	274	85.1				
Age group in years								
0-10	6	14.6	35	85.4	1	…	…	…
10-20	14	16.9	69	83.1	1.18 (0.42-3.35)	0.751	…	…
20-30	10	12.1	73	87.9	0.79 (0.27-2.37)	0.687	…	…
30-40	7	11.7	53	88.3	0.77 (0.24-2.48)	0.662	…	…
40-50	12	22.2	42	77.8	1.66 (0.57-4.90)	0.353	…	…
50-60	8	15.7	43	84.3	1.08 (0.34-3.42)	0.889	…	…
>60	6	15.0	34	85.0	1.03 (0.30-3.51)	0.963	…	…
Area of occurrence								
Urban	3	6.7	42	93.3	2.75 (0.83-9.18)	0.099	2.28 (0.66-7.84)	0.190
Rural	60	16.4	305	83.6				
Time-taken to reach to medical assistance (hour)								
0-3	30	12.2	215	87.8	1	…	1	…

4-6	15	17.6	70	82.4	1.54 (0.78-3.02)	0.214	0.83 (0.37-1.85)	0.644
>6	18	22.5	62	77.5	2.08 (1.08-3.98)	0.027	1.83 (0.88-3.79)	0.103
Pre-hospital treatment								
Yes	33	14.4	197	85.6	0.92 (0.46-1.84)	0.802	…	…
No	13	15.5	71	84.5				
Comorbidities								
Yes	8	17.8	37	82.2	1.24 (0.51-3.01)	0.637	…	…
No	22	14.9	126	85.1				
Unclottable blood								
Yes	48	21.4	176	78.6	**3.72 (1.86-7.42)**	**<0.001**	**3.11 (1.53-6.31)**	**0.002***
No	11	6.8	150	93.2				
Low hemoglobin								
Yes	11	17.7	51	82.3	1.29 (0.63-2.67)	0.486	…	…
No	44	14.3	264	85.7				
Low hematocrit								
Yes	5	11.1	40	88.9	0.68 (0.26-1.81)	0.444	…	…
No	50	15.5	273	84.5				
Thrombocytopenia								
Yes	13	39.4	20	60.6	**4.71 (2.18-10.15)**	**<0.001**	**4.52 (2.03-10.09)**	**<0.001***
No	42	12.1	304	87.9				
Mean platelet volume								
Low	5	14.7	29	85.3	1	…	1	…

Normal	44	13.5	282	86.5	0.91 (0.33-2.46)	0.845	0.70 (0.24-2.00)	0.503
High	4	44.4	5	55.6	4.64 (0.92-23.48)	0.064	3.46 (0.56-21.55)	0.182

*p<0.05 was considered significant. Thrombocytopenia: platelet count <150,000/μL; Low hemoglobin: <12.5 g/dL; Low hematocrit: <36%: Low mean platelet volume: <7.4 fL; High mean platelet volume: >10.4 fL.

3. Discussion

Bothrops snake envenomation usually results in systemic effects such as coagulation disorders and systemic bleeding [7,22]. Although systemic bleeding is a common clinical manifestation in *Bothrops* snakebites, the clinical-epidemiological and laboratorial factors associated with the development of this effect are not well known in relation to the envenomations that occur in the Amazon region. In this study, systemic bleeding was present in 15.3% of the *Bothrops* snakebite patients during hospitalization, the most common being conjunctival and gingival, in consonance with previous studies from the Brazilian Amazon [7,23,24]. However, this rate was lower than that observed in envenomations by other species of *Bothrops* in Central and South America [15,21,25], which suggests that other mechanisms may be involved in the development of systemic bleeding.

The majority of *Bothrops* snakebites occurred in males, between 11 and 30 years old, living in rural areas and were mainly unrelated to work. Most of our patients took less than 3 hours to reach medical assistance. These characteristics were also observed in other studies regarding the Brazilian Amazon and other regions of Brazil [4,21,23], as well as in other countries [16,26] However, there was no significant association between systemic bleeding and epidemiological aspects of *Bothrops* snakebites in this study, although age and time taken to reach medical assistance were independently associated with severity and mortality in other studies of snakebites conducted in the Brazilian Amazon [4].

In this study, thrombocytopenia was an infrequent event. This observation was similar to that found in another study carried out in Belém, Pará State, Brazil, where *B.*

atrox also causes most of the snakebites [7]. Contrary the this, *B. jararaca* snakebites showed a higher frequency of thrombocytopenia [15,21,22,27]. Most of the cases of systemic bleeding observed in our study showed a normal platelet count on admission, irrespective of the type of systemic bleeding, except for one case of petechiae. However, although thrombocytopenia is an uncommon finding, in this study thrombocytopenia on admission was independently associated with the development of systemic bleeding during hospitalization.

Indeed, platelets participate in reactions of hemostasis such as in adhesion to the cut end of a blood vessel, spreading of adherent platelets on the exposed subendothelial surface, secretion of stored platelet constituents, and formation of platelet aggregates [28,29]. In addition, platelets interact with proteins of the coagulation through surface receptors and phospholipids [30,31]. Recently, it has been observed that platelets also have roles in immune and inflammatory processes [32,33]. In snakebites, thrombocytopenia probably results from a multifactorial etiology as venom-induced platelet aggregation [34], sequestration to the areas of damage near the site of the bite [35] and venom-induced oxidative stress leading to a drop-in platelet count by apoptosis [36]. Components isolated from the *B. atrox* venom as thrombocytin [34], batroxostatin [37], botrocetin [38] and batroxrhagin [39] may be acting on platelets leading to thrombocytopenia or changes in platelet function.

On the other hand, a negative correlation was found between the number of platelets and mean platelet volume on patient admission, which suggests a consequence of peripheral platelet destruction in which the mean platelet volume tends to increase. Studies show large platelets are more reactive than ordinary size platelets, as measured by aggregation and total release of granular content [40]. However, the ROC curve showed that only platelet counts on admission are not a good predictor of systemic bleeding during hospitalization in this specific envenomation, indicating that other parameters are involved in the development of systemic bleeding during hospitalization.

In this study, unclottable blood on admission was observed in more than half of *Bothrops* snakebite patients. The coagulation disorders observed in *B. atrox* snakebites patients can be explained by the presence of components of the venom

with thrombin-like activity, which directly hydrolyze fibrinogen in fibrin [41–43] and pro-coagulants, which activate coagulation factors II and X [44,45], which results in the intravascular thrombin generation. Other coagulation factors activated by components isolated from *B. atrox* venom are the factors XIII [34] and V [46]. In addition, *B. atrox* venom components that present fibrin(geno)lytic activity can also contribute to coagulopathy [47]. Unclottable blood on admission was independently associated with the development of systemic bleeding during hospitalization in this study.

We observed a significative association between thrombocytopenia and unclottable blood on admission in *Bothrops* snakebites patients who developed systemic bleeding during hospitalization. Nonetheless, the poor results found in the discriminative analysis (ROC curve) prompts us to believe that these parameters alone are not the only ones involved in the systemic bleeding phenomena shown here. This corroborates with findings regarding *B. jararaca* snakebites patients, which suggest that systemic bleeding may occur in patients with coagulable blood and thrombocytopenia and that coagulation disorders are not therefore the primary cause of systemic bleeding [27]. Similar reports have been described with *B. atrox* snakebites in Colombia [20].

P-III SVMP is the markedly predominant toxin of the *B. atrox* venom, which comes from the snake responsible for the majority of snakebites in the Brazilian Amazon [12]. Interestingly, a PIII-SVMP called Batroxrhagin, the major component of *B. atrox* venom, is highly similar to Jarharagin, and is able to inhibit collagen-induced platelet-aggregation, hydrolyze fibrin, and is highly hemorrhagic [39]. P-III hemorrhagic SVMPs induce hemorrhage by their accumulation at the basement membrane by binding to collagens [48,49]. P-I SVMPs, such as batroxase [47] and atroxlysin-I [50], that induce bleeding through hydrolysis of extracellular matrix components have also been isolated from *B. atrox* venom. In addition, it has been observed in *Bothrops* snakebites that haemorrhagins present in snake venom cause local haemorrhage and systemic bleeding by the direct action on components of the basement membrane of capillaries [15,51]. Serum haemorraghin levels were significantly higher in patients with clinical signs of systemic bleeding than those without in envenomation by *B. jararaca* snakes. Haemorraghin levels were also correlated inversely with platelet count in these patients [15]. In our study, high serum haemorraghin levels probably could also contributed to

the development of systemic bleeding in *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon. However, these levels were not determined. Likewise, changes in platelet function were not evaluated.

Another aspect to be considered in this study was antivenom therapy of these *Bothrops* snakebites. *Bothrops* antigen used in Brazil to immunize horses in order to produce the antivenom consists of a mixture of venoms of *B. jararaca* (50%), *B. alternatus* (12.5%), *B. moojeni* (12.5%), *B. neuwiedi* (12.5%), and *B. jararacussu* (12.5%) (manufacturer's data). *B. atrox* venom is not included in the immunization pool used to produce *Bothrops* antivenom. Nevertheless, the results suggest that venom-induced systemic bleeding and unclottable blood were able to be ceased in most patients after 24 h of antivenom administration. These results were also found in other studies on *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon [7,19] and other regions of Brazil [22]. On the other hand, it has been noted that *Bothrops* antivenom is less effective for neutralizing factor X activation activity of *B atrox* venom when compared to prothrombin activation activity [52]. In contrast, the frequency of thrombocytopenia increased in the first 48 h after antivenom administration, though decreased on discharge, while the frequency of abnormal mean platelet volume showed a decrease on discharge. Studies propose that venom-induced oxidative stress could lead to thrombocytopenia by apoptosis [36]. In *Bothrops jararaca* and *B. jararacussu* snakebites, it was observed that *Bothrops* envenomation promotes persistent and pronounced oxidative stress in the blood of the victims up to 1 month after hospitalization [53], which could explain the thrombocytopenia observed in our study up to 48 h after antivenom administration.

In conclusion, systemic bleeding observed in *Bothrops* snakebite patients in this part of the Amazon was an important systemic effect of the envenomation. The prevalence of systemic bleeding in this study was similar to that of others from the same region, but lower than that of other *Bothrops* spp envenomations. Thrombocytopenia and unclottable blood detected on admission were independently associated with the risk of developing systemic bleeding during hospitalization, which suggests that these hemostatic disorders increase the chances of systemic bleeding. Moreover, the effect of other parameters such as some toxins components of the venom can be involved in the development of systemic bleeding. Prospective studies

are needed to elucidate the pathophysiology of systemic bleeding in *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon and identify the different factors involved in its development as well as on the therapeutic response of hemostatic disorders.

4. Materials and Methods

4.1. Study Design and Data Source

This was an observational, cross-sectional study designed to assess the prevalence of and factors associated with systemic bleeding in *Bothrops* snakebite patients. Clinical-epidemiological and laboratorial data were obtained from patients' records with clinical-epidemiological diagnosis of *Bothrops* envenomation who were attended to at the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), a specialist hospital for snakebites in Manaus, capital of the Amazonas State, Brazil, between August 2013 and July 2016. Eligible cases were those with clinical signs of *Bothrops* envenomation. Patients that underwent previous antivenom therapy in other health service centers were not included in this study. According to the Brazilian Ministry of Health Guidelines for Snakebite Diagnosis and Treatment [54], envenomation by *Bothrops* species is classified as follows: a) Mild, characterized by pain and mild or absent local edema, mild or absent systemic bleeding, with or without change in coagulation time; b) moderate: Characterized by pain and evident edema involving three or more segments of the affected limb, accompanied or not by systemic bleeding and coagulopathy; c) severe: Characterized by edema involving the entire affected limb, usually accompanied by severe pain. Systemic manifestations such as hypotension, shock, oliguria/anuria, or severe bleeding are defined as a severe case, regardless of the local effect. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of the FMT-HVD, Manaus, Brazil (approval number: 1.433.431, approval date: 2 March 2016). Term of commitment of use of data was signed by the researchers.

4.2. Clinical-epidemiological and Laboratorial Parameters

The clinical-epidemiological variables analyzed were gender, age (in years), geographical location of the occurrence of the snakebite, type of area where the

snakebite occurred (rural or urban), work-related bite, occupation, time taken to reach medical assistance (in hours), anatomical region of the bite, pre-hospital treatment (use of topical or oral medicines, use of tourniquet and other procedures), *Bothrops* bite confirmation by snake, local and systemic manifestations, clinical severity of envenomation (mild, moderate, or severe according to the Brazilian Health Ministry guidelines), presence of comorbidities, time spent in hospital (in days) and outcome (discharge or death). Analyzed laboratory variables were clotting time (in minutes), hemoglobin (mg/dL), hematocrit (%), platelet count (number/μL), and mean platelet volume (fL). The snakes were identified by a trained biologist at the FMT-HVD All variables were checked by two independent researchers before analysis and further investigated for possible association with systemic bleeding as a dependent variable.

Snakebite-induced coagulopathy was evaluated by a modification of the Lee-White clotting time (LWCT) [55] which is recommended by the Brazilian Ministry of Health. With the use of a plastic unlubricated syringe, 1 mL of venous blood was collected and placed into a new glass tube (13 × 75 mm) without any anticoagulants at 37°C. Using a stopwatch, the timing started as soon as the blood was drawn into the tube. The glass tube was left undisturbed for 5 min, and then checked for clots every following minute by gently tilting the tube. Unclottable blood was defined when the blood was not clotted until 30 min. The sensitivity of the LWCT performed in routine clinical settings for the diagnosis of hypofibrinogenemia is 78% [56]. Thrombocytopenia was defined by a platelet count below 150,000/μL. Low hemoglobin was defined when values were lower than 12.5 g/dL. Low hematocrit was defined when values were below 36%. Low and high mean platelet volume was defined when values were below 7.4 fL and above 10.4 fL, respectively. In order to identify clinical-epidemiological and laboratorial variables collected on admission associated with systemic bleeding, patients evolving to systemic bleeding on admission or during hospitalization were classified as a case, and one with non-systemic bleeding was included as a control. All patients were asked to return to the hospital for clinical reassessment in case of complications at any time, or on day 7 after discharge.

4.3. Statistical Analysis

A database and descriptive analyses were produced using Microsoft Excel Office 365 software which was fed information by two independent individuals. Statistical analyses were made using the software STATA statistical package version 13 (Stata Corp, College Station, TX, USA) and Graphpad Prism version 5 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA, USA). The Mann Whitney test was used for comparison of medians. Differences in results were considered statistically significant when $p<0.05$. The Pearson correlation coefficient was calculated to measure the degree of association between the platelet count and mean platelet volume on admission. The performance of platelet counts on admission to predict systemic bleeding during hospitalization in *Bothrops* snakebite patients was assessed using ROC curve.

Proportions of systemic bleeding during hospitalization were compared by Chi-square test (corrected by Fisher' test if necessary); differences were considered statistically significant for $p<0.05$. The crude Odds Ratio (OR) with its respective 95% Confidence Interval (95% CI) was determined considering systemic bleeding during hospitalization as the dependent variable. Logistic regression was used for the multivariable analyses and the adjusted Odds Ratios with 95% CI were also calculated. All variables associated with the outcome at a significance level of $p<0.20$ in the univariate analysis were included in the multivariable analysis. Statistical significance was considered if $p<0.05$ in the Hosmer-Lemeshow goodness-of-fittest.

Author Contributions: Conceptualization, S.S.O., I.S.S.-M. and W.M.M. methodology, S.S.O., I.S.S.-M. and W.M.M.; software, S.S.O.; validation, S.S.O., E.C.A., A.S.S., J.P.T.P., L.K.S.S. and E.F.N.; formal analysis, S.S.O., J.D.d.-B.-S., V.S.S.; investigation, S.S.O., E.C.A., A.S.S., J.P.T.P., L.K.S.S. and E.F.N.; resources, J.A.G.S. and W.M.M.; data curation, S.S.O., E.C.A., A.S.S., J.P.T.P., L.K.S.S. and E.F.N.; writing—original draft preparation, S.S.O.; writing—review and editing, J.A.G.S., M.V.G.L., I.S.S.-M. and W.M.M.; visualization, S.S.O., I.S.S.-M. and W.M.M.; supervision, I.S.S.-M. and W.M.M.; project administration, S.S.O.; funding acquisition, W.M.M.

Funding: This research was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES/PROCAD). M.V.G.L. and W.M.M. are CNPq fellows.

Acknowledgments: We thank Marcos Sabóia for his technical support with the database.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Kasturiratne, A.; Wickremasinghe, A. R.; Silva, N. De; Gunawardena, N. K. The Global Burden of Snakebite : A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. 2008, *5*, doi:10.1371/journal.pmed.0050218.
2. Brazilian Ministry of Health Acidente por animais peçonhentos- Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net Available online: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/animaisp/bases/animaisbrnet.def (accessed on Oct 12, 2018).
3. Brazilian Ministry of Health *Guia de Vigilância Epidemiológica*; 7. ed.; Ministério da Saúde: Brasília, 2009; ISBN 9788533416321.
4. Feitosa, E. L.; Sampaio, V. S.; Salinas, J. L.; Queiroz, A. M.; da Silva, I. M.; Gomes, A. a.; Sachett, J.; Siqueira, A. M.; Ferreira, L. C. L.; dos Santos, M. C.; Lacerda, M.; Monteiro, W. Older Age and Time to Medical Assistance Are Associated with Severity and Mortality of Snakebites in the Brazilian Amazon: A Case-Control Study. *PLoS One* 2015, *10*, e0132237, doi:10.1371/journal.pone.0132237.
5. Souza, A. S.; Sachett, J. A. G.; Alcântara, J. A.; Freire, M.; Alecrim, M. G. C.; Lacerda, M.; Ferreira, L. C. L.; Fan, H. W.; Sampaio, V. S.; Monteiro, W. M. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. *Toxicon* 2018, *145*, 15–24, doi:10.1016/j.toxicon.2018.02.041.
6. Wen, F. H.; Monteiro, W. M.; Moura da Silva, A. M.; Tambourgi, D. V.; Mendonça da Silva, I.; Sampaio, V. S.; dos Santos, M. C.; Sachett, J.; Ferreira, L. C. L.; Kalil, J.; Lacerda, M. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon:

Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015, *9*, e0003701, doi:10.1371/journal.pntd.0003701.

7. Pardal, P. P. O.; Souza, S. M.; Monteiro, M. R. C. C.; França, F. O. S.; Tomy, S. C.; Sano-Martins, I. S.; Sousa-e-Silva, M. C. C.; Colombini, M.; Kodera, N. F.; Moura-da-Silva, A. M.; Cardoso, D. F.; Velarde, D. T.; Kamiguti, A. S.; Theakston, R. D. G.; Warrell, D. A. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2004, *98*, 28–42, doi:10.1016/S0035-9203(03)00005-1.
8. Ribeiro, L. A.; Jorge, M. T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990, *32*, 436–442.
9. Ribeiro, L. A.; Albuquerque, M. J.; Pires de Campos, V. A. F.; Katz, G.; Takacka, N. Y.; Lebrão, M. L.; Jorge, M. T. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. *Rev Ass Med Bras.* 1998, *44*, 312–8.
10. Oliveira, S. S.; Freitas-de-Sousa, L. A.; Alves, E. C.; Ferreira, L. C. L.; Mendonça-da-Silva, I.; Lacerda, M. V. G.; Fan, H. .; Moura-da-Silva, A. M.; Monteiro, W. M. Fatal stroke after *Bothrops* snakebite in the Amazonas state, Brazil: A case report. *Toxicon* 2017, *138*, 102–106, doi:10.1016/j.toxicon.2017.08.021.
11. Rosenfeld, G. Symptomatology, pathology and treatment of snakes bites in South América. In *Venomous Animals and Their Venoms*; Bucgerl, W., Buckley, E. E., Eds.; Academic Press: New York, 1971; pp. 347–382.
12. Sousa, L. F.; Nicolau, C.; Peixoto, P. S.; Bernardoni, J. L.; Oliveira, S. S.; Portes-Junior, J. A.; Mourão, R. H. V.; Lima-dos-Santos, I.; Sano-Martins, I. S.; Chalkidis, H. M.; Valente, R. H.; Moura-da-Silva, A. M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013, *7*, e2442, doi:10.1371/journal.pntd.0002442.
13. Lu, Q.; Clemetson, J. M.; Clemetson, K. J. Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb. Haemost.* 2005, *3*, 1791–99.
14. Sajevic, T.; Leonardi, A.; Križaj, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. *Toxicon* 2011, *57*, 627–645, doi:10.1016/j.toxicon.2011.01.006.
15. Kamiguti, A. S.; Rugman, F. P.; Theakston, R. D. G.; França, F. O. S.; Ishii, H.; Hay, C.; BIASG The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. *Thromb. Haemost.* 1992, *67*, 484–88.

16. Málaque, C. M. S.; Gutiérrez, J. M. Snakebite envenomation in Central and South America. In *Critical Care Toxicology*; Brent, J., Ed.; Springer International: Switzerland, 2015; pp. 1–22 ISBN 978-3-319-20790-2.
17. Chippaux, J. P.; Whiliams, V.; White, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991, *29*, 1279–1303.
18. Sousa, L. F.; Portes-Junior, J. A.; Nicolau, C. A.; Bernardoni, J. L.; Nishiyama-Jr, M. Y.; Amazonas, D. R.; Freitas-de-Sousa, L. A.; Mourão, R. H.; Chalkidis, H. M.; Valente, R. H.; Moura-da-Silva, A. M. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. *J. Proteomics* 2017, *159*, 32–46, doi:10.1016/j.jprot.2017.03.003.
19. Mendonça-da-Silva, I.; Magela Tavares, A.; Sachett, J.; Sardinha, J. F.; Zaparolli, L.; Gomes Santos, M. F.; Lacerda, M.; Monteiro, W. M. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, *11*, 1–21, doi:10.1371/journal.pntd.0006068.
20. Otero, R.; Gutiérrez, J. M.; Núñez, V.; Robles, a.; Estrada, R.; Segura, E.; Toro, M. F.; García, M. E.; Díaz, a.; Ramírez, E. C.; Gómez, G.; Castañeda, J.; Moreno, M. E.; Cañadas, R.; Bernal, E.; De León, P.; Vanegas, I.; González, G.; Huertas, M.; Agudelo, M.; Dávila, M. E.; Lara, M.; Díaz, L. E.; Giraldo, M. E.; Guerrero, J. P.; Cardona, C.; Romero, D.; Aguirre, a.; Echeverri, M. L.; Palacio, J. D.; Osorio, R. G.; Del Valle, G.; Valderrama, R.; Cárdenas, S. Y. A randomized double-blind clinical trial of two antivenoms in patients bitten by *Bothrops atrox* in Colombia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1996, *90*, 696–700, doi:10.1016/S0035-9203(96)90442-3.
21. Santoro, M. L.; Sano-Martins, I. S.; Fan, H. W.; Cardoso, J. L.; Theakston, R. D. G.; Warrell, D. a. Haematological evaluation of patients bitten by the jararaca, *Bothrops jararaca*, in Brazil. *Toxicon* 2008, *51*, 1440–1448, doi:10.1016/j.toxicon.2008.03.018.
22. Cardoso, J. L. C.; Fan, H. W.; França, F. O. S.; Jorge, M. T.; Leite, R. P.; Nishioka, S. A.; Avila, A.; Sano-Martins, I. S.; Tomy, S. C.; Santoro, M. L.; Chudzinski, A. M.; Castro, S. C. B.; Kamiguti, A. S.; Kelen, E. M. A.; Hirata, M. H.; Mirandola, R. M. S.; Theakston, R. D. G.; Warrel, D. A. Randomized comparative trial of three antivenomsin the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. *Q. J. Med.* 1993, *86*, 315–325.

23. Sachett, J. A. G.; da Silva, I. M.; Alves, E. C.; Oliveira, S. S.; Sampaio, V. S.; do Vale, F. F.; Romero, G. A. S.; dos Santos, M. C.; Marques, H. O.; Colombini, M.; da Silva, A. M. M.; Wen, F. H.; Lacerda, M. V. G.; Monteiro, W. M.; Ferreira, L. C. L. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017, *11*, 1–21, doi:10.1371/journal.pntd.0005745.
24. Alves, E. C.; Gonc, J. D. A.; Sousa, D. D. B.; Oliveira, S. De; Nascimento, F.; Santos, S.; Moura, M.; Wen, F. H.; Monteiro, W. M.; Carlos, L.; Ferreira, D. L. Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. 2018, *01*, 1–16.
25. Otero-Patiño, R. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Bothrops* asper bites. *Toxicon* 2009, *54*, 998–1011, doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.001.
26. Chaves, L. F.; Chuang, T.; Sasa, M.; Gutiérrez, J. M. Snakebites are associated with poverty, weather fluctuations, and El Niño. *Sci. Adv.* 2015, *1*, 7, doi:10.1126/sciadv.1500249.
27. Kamiguti, A. S. et al. Coagulopathy and Haemorrhage in Human Victims. *Toxicon* 1991, *29*, 961–972.
28. Colman, R. W.; Clowes, A. W.; Golhaber, S. Z.; Marder, V. J.; George, J. N. Overview of hemostasis. In *Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice*; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2006; pp. 1–51.
29. de Queiroz, M. R.; de Sousa, B. B.; da Cunha Pereira, D. F.; Mamede, C. C. N.; Matias, M. S.; de Morais, N. C. G.; de Oliveira Costa, J.; de Oliveira, F. The role of platelets in hemostasis and the effects of snake venom toxins on platelet function. *Toxicon* 2017, *133*, 33–47, doi:10.1016/j.toxicon.2017.04.013.
30. Roberts, H. R.; Lozier, J. N. New perspective on the coagulation cascade. *Hosp. Prat.* 1992, 97–112.
31. Hoffman, M. Remodeling the blood coagulation cascade. *J. Thromb. Thrombolysis* 2003, *16*, 17–20, doi:10.1023/B:THRO.0000014588.95061.28.
32. Katoh, N. Platelets as versatile regulators of cutaneous inflammation. *J. Dermatol. Sci.* 2009, *53*, 89–95, doi:10.1016/j.jdermsci.2008.08.019.
33. Von Hundelshausen, P.; Weber, C. Platelets as immune cells: Bridging inflammation and cardiovascular disease. *Circ. Res.* 2007, *100*, 27–40, doi:10.1161/01.RES.0000252802.25497.b7.

34. Niewiarowski, S.; Kirby, E. P.; Brudzynski, T. M.; Stocker, K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. *Biochemistry* 1979, *18*, 3570–3577.
35. Simon, T. L.; Brace, T. G. Envenomation coagulopathy in wounds from pit vipers. *N Engl J Med* 1981, *305*, 443–47, doi:10.1056/NEJM198603063141003.
36. Sunitha, K.; Hemshekhar, M.; Thushara, R. M.; Santhosh, M. S.; Sundaram, M. S.; Kemparaju, K.; Girish, K. S. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. *Toxicon* 2015, *98*, 89–97, doi:10.1016/j.toxicon.2015.02.014.
37. Rucinski, B.; Niewiarowski, S.; Holt, J. C.; Soszka, T.; Knudsen, K. a Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. *Biochim. Biophys. Acta* 1990, *1054*, 257–262, doi:10.1016/0167-4889(90)90096-V.
38. Read, M. S.; Shermer, R. W.; Brinkhous, K. M. Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1978, *75*, 4514–4518, doi:10.1073/pnas.75.9.4514.
39. Freitas-De-Sousa, L. A.; Amazonas, D. R.; Sousa, L. F.; Sant'Anna, S. S.; Nishiyama, M. Y.; Serrano, S. M. T.; Junqueira-De-Azevedo, I. L. M.; Chalkidis, H. M.; Moura-Da-Silva, A. M.; Mourão, R. H. V. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. *Biochimie* 2015, *118*, 60–70, doi:10.1016/j.biochi.2015.08.006.
40. Elsayed, A. M.; Mohamed, G. A. Mean platelet volume and mean platelet volume/platelet count ratio as a risk stratification tool in the assessment of severity of acute ischemic stroke. *Alexandria J. Med.* 2017, *53*, 67–70, doi:10.1016/j.ajme.2016.03.003.
41. Blomback, B. Studies on the action of thrombic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. *Ark. Kemi* 1958, *12*, 321.
42. Stocker, K.; Barlow, G. H. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). *Methods Enzymol.* 1976, *45*, 214–223.
43. Petretski, J. H.; Kanashiro, M.; Silva, C. P.; Alves, E. W.; Kipnis, T. L. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 2000, *33*, 1293–1300, doi:10.1590/S0100-879X2000001100005.

44. Hofmann, H.; Bon, C. Blood Coagulation Induced by the Venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, Purification, and Properties of a Prothrombin Activator. *Biochemistry* 1987, *26*, 772–780, doi:10.1021/bi00377a018.
45. Hofmann, H.; Bon, C. Blood Coagulation Induced by the Venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, Purification, and Properties of Two Factor X Activators. *Biochemistry* 1987, *26*, 780–787.
46. Rosing, J.; Govers-Riemslag, J. W.; Yukelson, L.; Tans, G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. *Haemostasis* 2002, *31*, 241–246, doi:10.1159/000048069.
47. Cintra, A. C. O.; De Toni, L. G. B.; Sartim, M. A.; Franco, J. J.; Caetano, R. C.; Murakami, M. T.; Sampaio, S. V. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. *Toxicon* 2012, *60*, 70–82, doi:10.1016/j.toxicon.2012.03.018.
48. Herrera, C.; Escalante, T.; Voisin, M. B.; Rucavado, A.; Morazán, D.; Macêdo, J. K. A.; Calvete, J. J.; Sanz, L.; Nourshargh, S.; Gutiérrez, J. M.; Fox, J. W. Tissue Localization and Extracellular Matrix Degradation by PI, PII and PIII Snake Venom Metalloproteinases: Clues on the Mechanisms of Venom-Induced Hemorrhage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015, *9*, 1–20, doi:10.1371/journal.pntd.0003731.
49. Baldo, C.; Jamora, C.; Yamanouye, N.; Zorn, T. N.; Moura-da-Silva, A. M. Mechanisms of vascular danage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, *4*, 1–10, doi:10.1371/journal.pntd.0000727.
50. Sanchez, E. F.; Schneider, F. S.; Yarleque, A.; Borges, M. H.; Richardson, M.; Figueiredo, S. G.; Evangelista, K. S.; Eble, J. A. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. Arch. Biochem. Biophys. 2010, 496, 9–20, doi:10.1016/j.abb.2010.01.010.
51. Gutiérrez, J. M.; Rucavado, A.; Escalante, T.; Díaz, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon* 2005, *45*, 997–1011, doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.029.
52. Sousa, L. F.; Zdenek, C. N.; Dobson, J. S.; Op den Brouw, B.; Coimbra, F.; Gillett, A.; Del-Rei, T. H. M.; Chalkidis, H. de M.; Sant'Anna, S.; Teixeira-da-Rocha, M. M.; Grego, K.; Travaglia Cardoso, S. R.; Moura da Silva, A. M.; Fry, B. G.

Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. Toxins (Basel). 2018, 10, doi:10.3390/toxins10100411.

53. Strapazzon, J. de O.; Parisotto, E. B.; Moratelli, A. M.; Garlet, T. R.; Bastos, J.; Zimermann, I. R.; Zanin, M.; Fagundez, R.; Lino, M. R. de O.; Fröde, T. S.; Wilhelm Filho, D. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. J. Appl. Biomed. 2015, 13, 161–167, doi:10.1016/j.jab.2014.11.002.
54. Brasil Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos; Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica: Brasília, 2001; ISBN 85-7346-014-8.
55. Lee, R.; White, P. A clinical study of the coagulation time of blood. Am J Med Sci 1913, 145, 495.
56. de Brito Sousa, J. D.; Sachett, J. A. G.; de Oliveira, S. S.; Mendonça-da-Silva, I.; Marques, H. O.; de Lacerda, M. V. G.; Fan, H. W.; Monteiro, W. M. Accuracy of the lee–white clotting time performed in the hospital routine to detect coagulopathy in *Bothrops atrox* envenomation. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2018, 98, 1547–1551, doi:10.4269/ajtmh.17-0992.

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

3.2. Manuscrito científico 2 (redigido conforme normas da revista *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, à qual será submetido):

Changes on coagulation factors and platelets after *Bothrops* envenomation in the Brazilian Amazon

Sâmella Silva de Oliveira[a,b], Eliane Campos Alves[a,b], Alessandra dos Santos Santos[a], Elizandra Freitas do Nascimento[a], João Pedro Tavares Pereira[a], Iran Mendonça da Silva[a,b], Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett[a,b], Hiochelson Najibe dos Santos Ibiapina[a,b], Lybia Kássia Santos Sarraff[a], Luciana Aparecida Freitas de Sousa[c], Mônica Colombini[c], Hedylamar Oliveira Marques[d], Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda[a], Ana Maria Moura da Silva[c], Luiz Carlos de Lima Ferreira[a], Ida Sigueko Sano Martins[e,ϕ] and Wuelton Marcelo Monteiro[a,b,ϕ]

[a]Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil;
[b]Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil;
[c]Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil;
[d]Laboratório de Hemostasia, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil;
[e]Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.

[ϕ] These authors contributed equally to this work.

Summary.

Background: Unclottable blood is the commonest hemostatic disorder in *Bothrops* snakebite patients in the Brazilian Amazon and is associated with the risk of systemic bleeding. Little is known about the alterations of plasma coagulation factors and platelets of *Bothrops* envenomation in this region. *Objective*: To evaluate the changes in clotting factor levels and platelet counts in *Bothrops* snakebite patients with unclottable blood as well as systemic bleeding in the Brazilian Amazon. Patients/*Methods*: This is a prospective study of *Bothrops* snakebite patients (n=100)

seen in Manaus, Brazilian Amazon, between January, 2016 and December, 2017. Venom concentration, platelets count, clotting time and factors on admission and before antivenom therapy were measured. The presence of systemic bleeding was recorded during the follow-up. *Results:* Unclottable blood was characterized by low levels of factor V, fibrinogen, plasminogen and alpha 2-antiplasmin, and high levels of tissue factor, fibrin/fibrinogen degradation product and D-dimer; median levels of fator VII and X, and platelet counts were within the normal range. These characteristics were also observed in patients with systemic bleeding. A few cases of thrombocytopenia were observed after envenomation but were more frequent in patients with unclottable blood as well as with systemic bleeding. There was no association between venom levels and unclottable blood or systemic bleeding. *Conclusions*: Prospective studies are needed to evaluate the effect of other parameters, such as some toxins components of the venom and the changes in platelet function.

Keywords: *Bothrops atrox*, unclottable blood, systemic bleeding, thrombocytopenia.

Introduction

In Latin American and the Caribbean at least 137,000 snakebite envenomation and 3,400 deaths occur annually (1). *Bothrops atrox*, the common lancehead, is the most common venomous snake in the Amazon, and it is encountered in both rainforest and around human habitations, including in urban areas (2,3). *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon have an incidence rate of 37.2 cases per 100,000 inhabitants/year and they are more incident in lowlands, with high preserved original vegetation cover, with heaviest rainfall and higher air relative humidity (4).

Unclottable blood is the commonest hemostatic disorder observed in *Bothrops* snakebites patients in the Brazilian Amazon (5–8). *B. atrox* venom contains factor II and factor X activators and thrombin-like components that lead to the consumption of fibrinogen, which can result in coagulation disorders [12–16]. Previous study has shown that *Bothrops* envenomation in Pará State, in the Brazilian Amazon, causes decreased levels of fibrinogen and alpha 2-antiplasmin, and elevated fibrin/fibrinogen degradation product (FDP) and D-dimer concentrations (5). Furthemore, it has been

shown that unclottable blood and thrombocytopenia are independently associated with the risk of systemic bleeding in the *Bothrops* envenomation (6,9).

The variability in the composition of snake venoms has been reported according to snake ontogeny (10,11), sex (12), geographic distribution (13,14) or habitat type (15). As a result, it has also been observed differences in the coagulant activity of venom samples from *B. atrox* snakes from distinct locations (16,17), habitat (15) and ontogenetic stage (10), as well as when compared to the venom of other *Bothrops* species (18). However, little information has been reported on the changes in hemostasis in *Bothrops* snakebites patients in the Amazon Brazilian. Similarly, little is known about how the other coagulation factors, besides fibrinogen, are affected after *Bothrops* envenomation in this region. Moreover, this knowledge could contribute to understand the risk of systemic bleeding in patients. Thus, the aim of this study was to evaluate the changes in clotting factor levels and platelet counts in *Bothrops* snakebite patients with unclottable blood as well as systemic bleeding in the Brazilian Amazon.

Methods

Study design

This is a prospective study to evaluate the changes in clotting factor levels and platelet counts in *Bothrops* snakebite patients in the Brazilian Amazon. This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), Manaus, Amazonas State, Brazil (approval number: 1.302.174). All participants and their parents/guardians for minors provided written and informed consent.

Participants and data collection

We evaluated 100 patients with clinical–epidemiological diagnosis of *Bothrops* envenomation who were attended to at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD) from 2016 to 2017 of a study of therapeutic recovery from hemostatic disorders performed during this period. Victims that underwent previous

antivenom therapy in other health service centers or had age ≤12 years were not included in the study. Patients had serum and citrate plasma samples collected on admission and before of the antivenom therapy. All serum and plasma samples were immediately centrifuged after the collection, frozen and stored at -80°C.

A standard form was filled with features of patient such as gender, age, area where the snakebite occurred (rural or urban), work-related bite, time to reach medical assistance, anatomical location of bite, pre-hospital treatment (use of topical or oral medicines, use of tourniquet and other procedures), *Bothrops* bite confirmation by snake, presence of systemic bleeding (before or after of the antivenom therapy), presence of comorbidities and clinical severity of envenomation (mild, moderate, or severe cases according the Brazilian Ministry of Health guidelines (19)).

Laboratorial analysis

Clotting time was determined by the 20 min whole blood clotting test (20–22). Assays of coagulation factors were carried out on samples containing sodium citrate as anticoagulant and 2% v/v *Bothrops-Lachesis* antivenom (to neutralize *Bothrops* venom present in the sample). Tissue factor was measured by human EIA kit (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Factor VII was estimated using deficient plasma with a semi-automatic Start4 coagulation analyzer (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, France). Levels of factors II and X were determined by performing a modified prothrombin time test using deficient plasmas with an ACL TOP 300 CTS coagulation analyzer (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain). Factor V was determined using the standardized method of Denson (23,24). Fibrinogen was measured based on the Clauss method (25) with an ACL TOP 300 CTS coagulation analyzer (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain). Fibrin/fibrinogen degradation product (FDP) was qualitative and semi-quantitative determined by latex agglutination (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, France). D-Dimer was measured by immunoturbidimetry with an ACL TOP 300 CTS coagulation analyser (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain). Plasminogen was determined by chromogenic assay (American Diagnostica Inc., Greenwich, United Kingdom). Alpha 2-antiplasmin was determined by the synthetic chromogenic substrate method (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, France). All assays were performed

according to the manufacturer's protocol. Platelet counts were carried out on samples containing potassium EDTA as anticoagulant and 2% v/v *Bothrops-Lachesis* antivenom, and determined in an automated cell counter (Sysmex Corp., Kobe, Japan).

Venom-specific enzyme immune assays (EIA) was used for detection and measurement of circulating *Bothrops* venom in serum samples. Antigens were captured with *Bothrops-Lachesis* antivenoms coated on ELISA plates and the bound toxins reacted with a second antibody raised in rabbits against *B. atrox* venom, followed by incubation with anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate. Reactions were revealed by addition of the enzyme substrates (OPD plus H_2O_2), and recorded at 492 nm. Values were calculated using standard curves with known concentrations of *B. atrox* venom. The cut-off level corresponded to the mean plus 2 S.D. values of negative samples obtained from 14 volunteer donors with no history of snakebite who were accompanying the patients during hospitalization.

Outcomes

The laboratorial outcome was the presence of unclottable blood on admission and before antivenom therapy. Unclottable blood was defined when the blood was not clotted within 20 min after collecting. The clinical outcome was the presence of systemic bleeding on admission and before antivenom therapy, or during hospitalization.

Data analysis

A database and descriptive analyses were produced using Microsoft Excel Office 365 software which was fed information by two independent typists. Statistical analyses were made using the software Graphpad Prism version 5 (Graphpad Software, Inc., San Diego, USA) and STATA statistical package version 13 (Stata Corp, College Station, USA). Mann-Whitney test was used for comparison of medians. Differences in results were considered statistically significant when $p<0.05$.

Results

Patients'characterization

A total of 100 patients were included in this study. Fifty-four presented unclottable blood on admission and before antivenom therapy, and 20 showed systemic bleeding on admission or during hospitalization (Fig 1). Epidemiological and clinical features of patients on admission based on status of clotting time and presence of systemic bleeding are presented in Table 1. Thirty-six patients brought the snake that caused accident. All of them were identified as *B. atrox*. In 16/36, EIA had detected snake venom. Also, EIA detected *Bothrops* venom in serum samples of 35/100 patients.

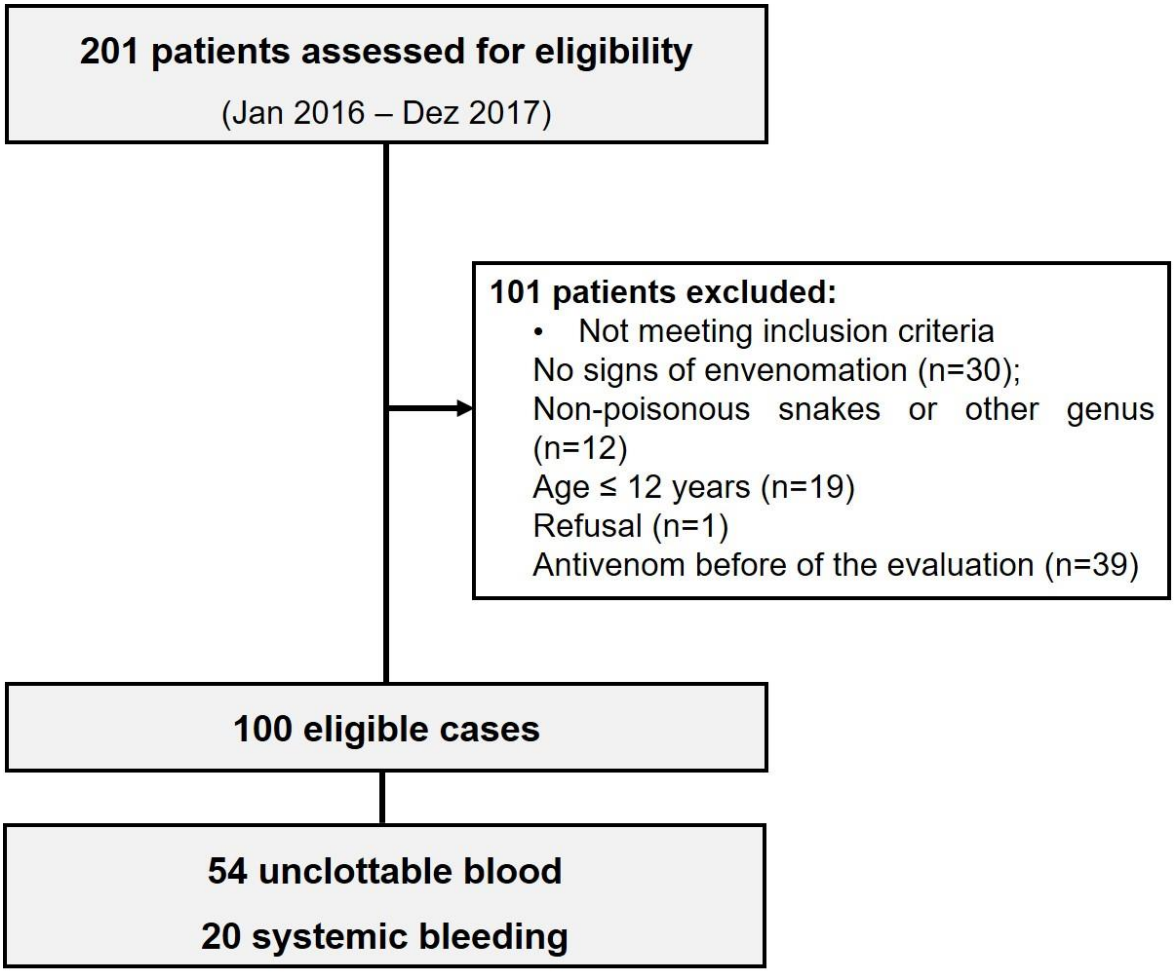


Figure 1. Flowchart for the inclusion of *Bothrops* envenomation in our study.

Table 1. Epidemiological and clinical features of the *Bothrops* envenomation on admission based on status of clotting time and presence of systemic bleeding.

Characteristics	Unclot* n (%)	Clot* n (%)	SB* n (%)	Non-SB* n (%)	Total n (%)
Gender					
Male:female	48:6	40:6	18:2	70:10	88:22
Age (median) years (range)	33 (14-79)	49 (14-76)	33 (15-58)	44 (14-79)	42 (14-79)
Area of occurrence					
Rural:urban	51:3	41:5	20:0	72:8	92:8
Work-related bite	26 (56.5)	20 (43.5)	10 (21.7)	36 (78.3)	46 (46)
Time to reach to medical assistance (hours)					
<3	21 (45.6)	25 (54.4)	7 (15.2)	39 (84.8)	46 (46)
3-6	20 (58.8)	14 (41.2)	5 (14.7)	29 (85.3)	34 (34)
>6	13 (65.0)	7 (35.0)	8 (40.0)	12 (60.0)	20 (20)
Anatomical location of bite					
Foot	45 (61.6)	28 (38.4)	16 (21.9)	57 (78.1)	73 (73)
Leg	4 (21.1)	15 (78.9)	2 (10.5)	17 (89.5)	19 (19)
Hand	5 (62.5)	3 (37.5)	2 (25.0)	6 (75.0)	8 (8)
Pre-hospital treatment					
Tourniquets	11 (45.8)	13 (54.2)	5 (20.8)	19 (79.2)	24 (24)
Local incisions	2 (50.0)	2 (50.0)	1 (25.0)	3 (75.0)	4 (4)
Suction	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	1 (1)
Use of topical/oral medicines	34 (61.8)	21 (38.2)	14 (25.5)	41 (74.5)	55 (55)
Comorbidities					
Arterial hypertension	5 (31.2)	11 (68.8)	1 (6.2)	15 (93.8)	16 (16)
Diabetes	3 (50.0)	3 (50.0)	1 (16.7)	5 (83.3)	6 (6)
Cardiopathy	0 (0.0)	1 (100.0)	0 (0.0)	1 (100.0)	1 (1)

Clinical severity of envenomation					
Mild	8 (29.6)	19 (70.4)	1 (3.7)	26 (96.3)	27 (27)
Moderate	35 (59.3)	24 (40.7)	14 (23.7)	45 (76.3)	59 (59)
Severe	11 (78.6)	3 (21.4)	5 (35.7)	9 (64.3)	14 (14)

* Unclot: unclottable blood; clot: clottable blood; SB: systemic bleeding; Non-SB: without systemic bleeding.

Laboratorial findings

Unclottable blood on admission and before antivenom therapy in *Bothrops* snakebites patients was associated with low levels of factor V ($p<0.001$), factor II ($p<0.001$), fibrinogen ($p<0.001$), plasminogen ($p<0.001$), and alpha 2-antiplasmin ($p<0.001$), and high levels of tissue factor ($p<0.001$), FDP ($p<0.001$), and D-dimer ($p<0.001$). No significant difference was registered in the median amount of factor VII ($p=0.676$), factor X ($p=0.091$), and platelet count ($p=0.098$) between patients with unclottable or clottable blood (Fig 2).

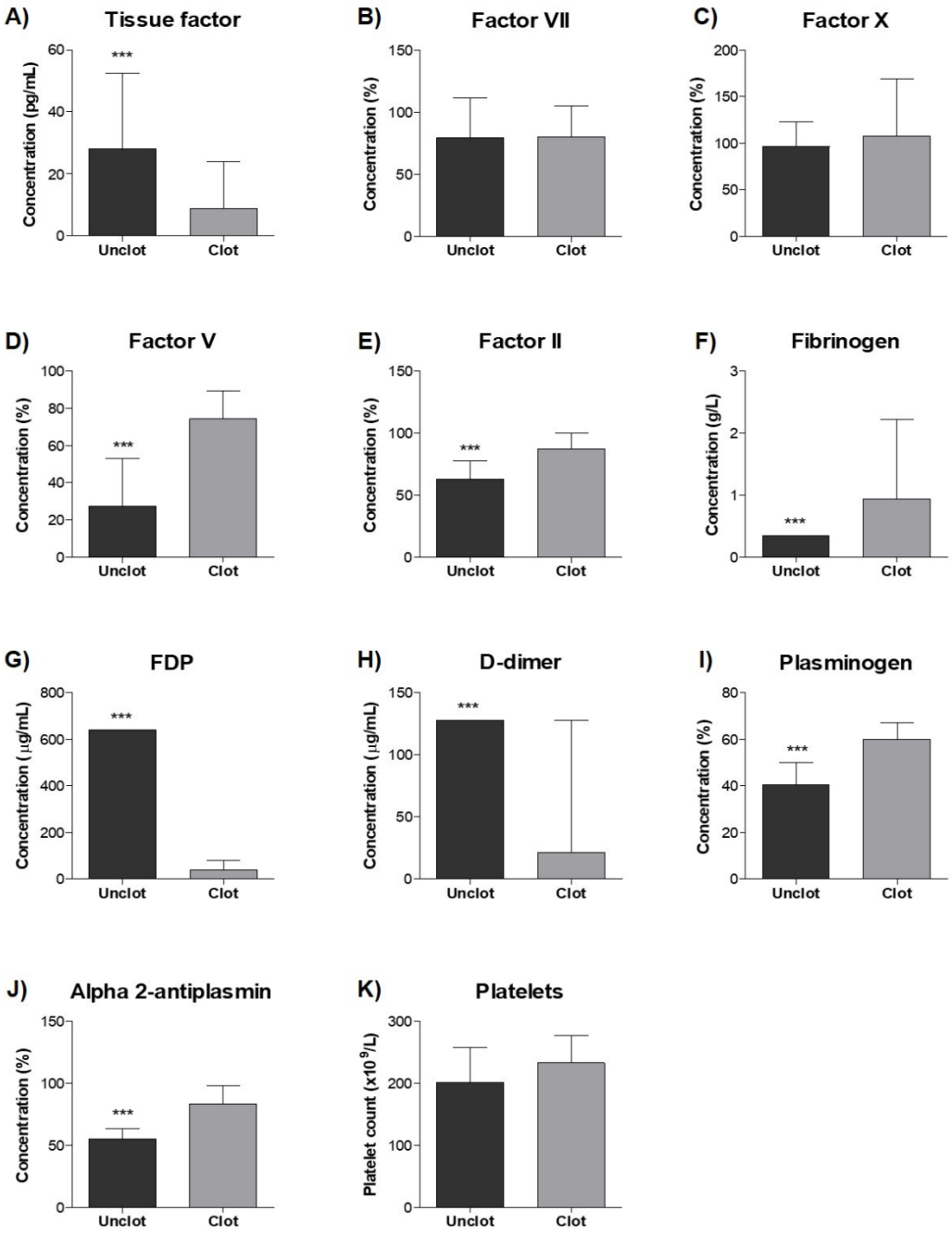


Figure 2. Plasma concentration of tissue factor (A), Factor VII (B), Factor X (C), Factor V (D), Factor II (E), fibrinogen (F), FDP (G), D-dimer (H), plasminogen (I), alpha 2-antiplasmin (J) and platelet counts (K) on admission and before antivenom therapy from patients with unclottable (unclot) and clottable blood (clot) after envenomation by Amazon *Bothrops* snakes. Results are expressed as medians and interquartile ranges. ***p<0.001 comparing patients with unclottable and clottable blood. FDP: fibrin/fibrinogen degradation product. Normal range: tissue factor = 0-15.3 pg/mL; FVII = 55-170%; FX = 77-131%; FV = 56-124%; FII = 79-131%;

fibrinogen = 2.38-4.98 g/L; FDP < 5µg/mL; D-dimer ≤ 0.5 ng/mL; plasminogen = 80-120%; alpha 2-antiplasmin = 80-120%; platelet count = 150-450 $x10^9$/L.

Systemic bleeding on admission or during hospitalization in *Bothrops* snakebites patients was associated with low levels of factor V ($p<0.001$), factor II ($p<0.01$), fibrinogen ($p<0.01$), plasminogen ($p<0.001$), and alpha 2-antiplasmin ($p<0.01$), and high levels of tissue factor ($p<0.01$), FDP ($p<0.01$), and D-dimer ($p<0.01$). No significant difference was registered in the median amount of factor VII ($p=0.529$) and factor X ($p=0.175$) between patients with or without systemic bleeding. Although the median platelet count are within normal range, significant statistical diferences ($p<0.01$) were observed in both groups (Fig 3).

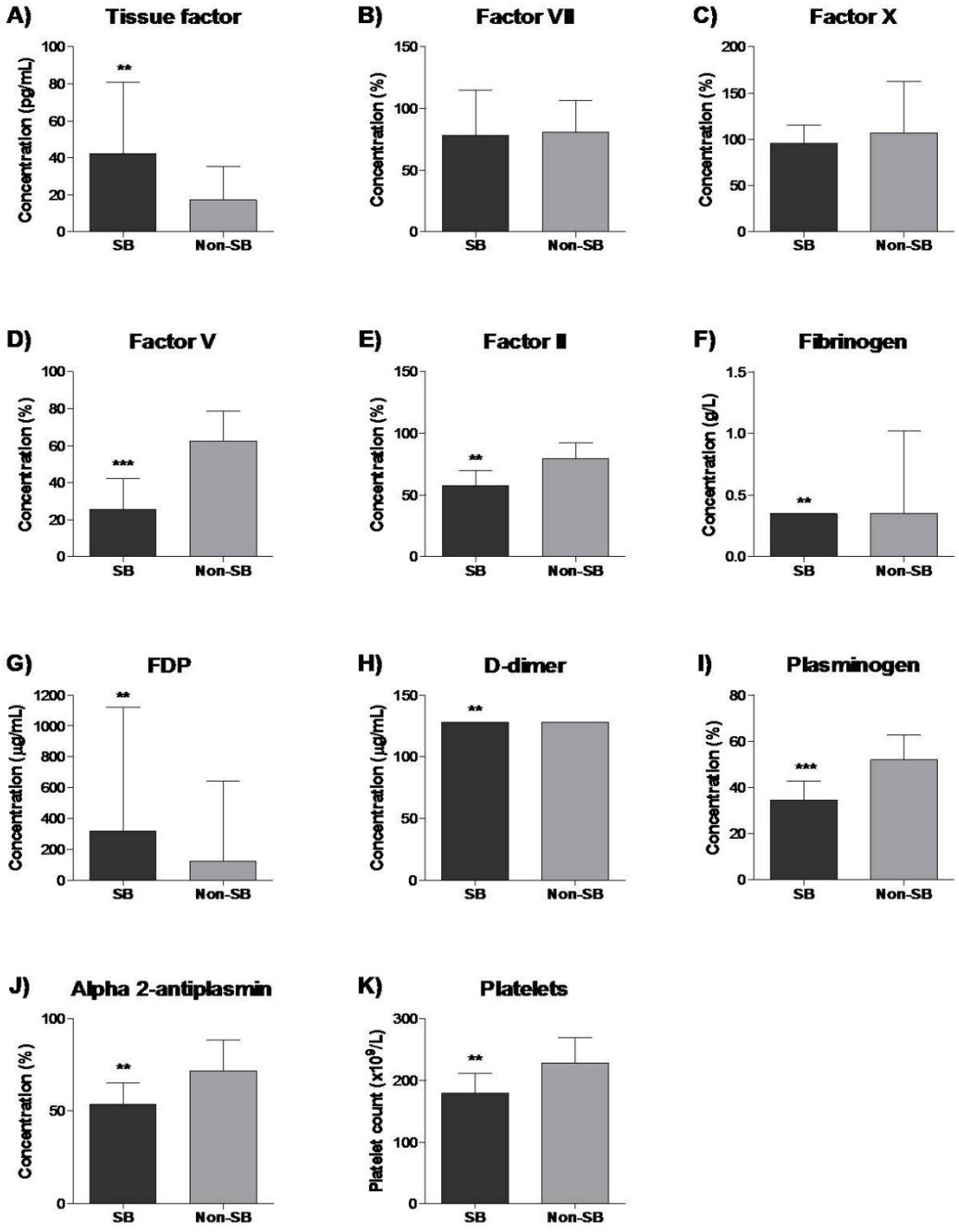


Figure 3. Plasma concentration of tissue factor (A), Factor VII (B), Factor X (C), Factor V (D), Factor II (E), fibrinogen (F), FDP (G), D-dimer (H), plasminogen (I), alpha 2-antiplasmin (J) and platelet count (K) on admission and before antivenom therapy from patients with systemic bleeding (SB) and non-systemic bleeding (non-SB) after envenomation by Amazon *Bothrops* snakes. Results are expressed as medians and interquartile ranges. ***p<0.001 and **p<0.01 comparing patients with and without systemic bleeding. FDP: fibrin/fibrinogen degradation product. Normal range: tissue factor= 0-15.3 pg/mL; FVII = 55-170%; FX = 77-131%;

FV = 56-124%; FII = 79-131%; fibrinogen = 2.38-4.98 g/L; FDP < 5µg/mL; D-dimer ≤ 0.5 ng/mL; plasminogen = 80-120%; alpha 2-antiplasmin = 80-120%; platelet count = 150-450 $x10^9$/L.

Thrombocytopenia (platelet count < 150 $x10^9$/µL) was observed in patients with unclottable (7/54, 12.96%) and clottable (3/46, 6.52%) blood, and in patients with (4/20, 20.0%) and without (6/80, 7.50%) systemic bleeding. Unclottable blood was observed in 19/20 (95.0%) patients with systemic bleeding and 35/80 (43.75%) patients without systemic bleeding. There was no significant difference in the venom level between patients with unclottable ((median= 20.25 ng/mL .serum (IQR: 4.84 – 28.81 ng/mL serum)) and clottable blood ((median= 7.73 ng/mL serum (IQR: 3.05 – 29.61 ng/mL serum)) (p= 0.632) neither between patients with: ((median= 21.08 ng/mL serum (IQR: 5.05 – 52.38 ng/mL serum)) and without systemic bleeding ((median= 9.69 ng/mL serum (IQR: 0.69 – 27.22 ng/mL serum)) (p=0.470).

Discussion

Unclottable blood and systemic bleeding are the commonest hemostatic disorder and frequently coexist in victims of *Bothrops* snakebite (6,9). The variability in the composition and biological activities of snake venoms could lead to different mechanisms of action in the induction of unclottable blood as well as systemic bleeding in *Bothrops* envenomation (17). There is little information about coagulation factor levels and platelet counts after *Bothrops* envenomation in the Amazon region. Thus, we investigated these disorders in *Bothrops* snakebite patients with unclottable blood as well as systemic bleeding. The unclottable blood was characterized by low levels of factor V, fator II, fibrinogen, plasminogen and alpha 2-antiplasmin, and high levels of tissue factor, FDP and D-dimer. Nevertheless, the median levels of fator VII and X, and platelet counts were within the normal range. These characteristics were also observed in patients with systemic bleeding. There was no association between venom levels and unclottable blood or systemic bleeding.

It has been observed that between 42% and 58% of *Bothrops* snakebite patients in the Brazilian Amazon present unclottable blood (5,6). In our study, unclottable blood was observed in 54% of the patients, similarly to the previously observed in this region

and in *B. jararaca* envenomation in São Paulo State, Brazil (9,26). The unclottable blood observed in *B. atrox* envenomation can be explained by presence of components with thrombin-like activity, which directly hydrolyze fibrinogen in fibrin (27–29) and pro-coagulants toxins, which activate factors II and X (30,31) leading to intravascular thrombin generation. The intravascular thrombin generation could also result in consumption of factors V, VIII, XI, XIII and fibrinogen as well as thrombocytopenia (32,33). In addition, components with fibrinogenolytic activity were isolated from *B. atrox* venom (34). The hypofibrinogenemia observed in patients with unclottable blood in our study could be a consequence of this joint action.

Indeed, factors V and II activities decreased in the patients with unclottable blood. Other explanation for the low levels of factor V could be its activation by *B. atrox* venom (35). Factors X and VII activities in the patients with unclottable blood were within the normal range, suggesting that only minute amounts are required to induce coagulopathy. Also, other explanation could be the increased hepatic synthesis of these factors that may occur in stressful situations (36). High factor VII levels have been reported after envenomation with other snakes (37). Interestingly, in individuals with deficiencies of factors X and VII have been observed serious clinical bleeding syndromes (38,39). All these changes in factors levels in our study were similar to those observed in *B. jararaca* envenomation (40). In addition, plasma tissue factor levels in the patients with unclottable blood was elevated, as demonstrated previously in envenomed rats with *B. jararaca* venom (41). High levels of tissue factor could be the result of the direct action of *Bothrops* venom on components of the basement membrane of capillaries and by leading the activation of circulanting platelets and monocytes (41–43). Thus, high levels of tissue factor could also be contributing to the development of unclottable blood in our study. On the other hand, tissue factor pathway inhibitor was not measured herein.

B. atrox venom also present fibrinolytic activity in vitro independently of plasminogen activation (34,44,45). In addition, *B. atrox* venom present components which activate factor XIII in a manner similar to thrombin (Niewiasski, 1979), which could be inducing cross-linking of the fibrin polymer and resulting also in comsumption of factor XIII. In our study, unclottable blood was accompanied by increased levels of FDP and D-dimer, as well as decreased levels of plasminogen and alpha 2-

antiplasmin, indicating that a secondary activation of the endogenous fibrinolytic system also occured. Thus, plasmin, produced from plasminogen (inactive pro-enzyme), cleaves cross-linked fibrin by the activated factor XIII resulting in the generation of D-dimer. Alpha-2 antiplasmin inhibits plasmin (32). In *B. atrox* (in Pará State, Brazil) and *B. jararaca* envenomations also were observed high levels of FDP and D-dimer, and low levels of alpha 2-antiplasmin (5,26).

In a recent study performed in the Amazon Brazilian it was observed that unclottable blood and thrombocytopenia were independently associated with the risk of developing systemic bleeding in *Bothrops* envenomation (6). Indeed, the majority of patients with systemic bleeding in our study presented unclottable blood. And, the changes in clotting factor levels observed in patients with systemic bleeding were also similar to those in patients with unclottable blood. However, median platelet count in our study was normal even for patients with unclottable blood, as well as for patients with systemic bleeding. A few cases of thrombocytopenia were observed herein, although isolated components of the *B. atrox* venom such as thrombocytin (46), botrocetin (47), batroxrhagin (45) and batroxostatin (48), can act on platelets, causing thrombocytopenia or changes in platelet function. Indeed, the major toxic component of *B. atrox* venom is the batroxrhagin, a PIII snake venom metaloproteinase that inhibits collagen-induced platelet-aggregation, induces bleeding and fibrin lysis (45). Also, it was observed that the crude venom of *B. atrox* has no aggregating activity on washed platelets of rabbits (49). On the other hand, changes in platelet function were not evaluated in our study. Additionally, thrombocytopenia was more frequent in patients with unclottable blood or systemic bleeding that those without in these manifestations. In *B. jararaca* envenomation, thrombocytopenia is observed in about 50% of patients and is also associated with systemic bleeding and alterations of coagulation (9,40,50).

The most abundant toxins found in the *B. atrox* venoms in the Amazon Brazilian are metalloproteinases, c-type lectin-like toxins, phospholipases A_2 and serineproteinases, and frequently are involved in the hemostatic disorders observed in snakebites patients (14,51). In our study, no significant difference in the venom levels was observed between patients with and without unclottable blood. In contrast, a correlation between venom levels and the severity of the coagulopathy has been

observed in envenomations caused by other snake genus (37). Similarly, no significant difference in the venom levels was observed between patients with and without systemic bleeding. However, higher serum hemorraghin levels, which have direct action on components of the basement membrane of capillaries, have been observed in patients with systemic bleeding in *B. jararaca* envenomation (43,52). Serum hemorraghin levels were not measured in our study.

In conclusion, the changes on coagulation factors were similar to that of others *Bothrops* envenomations from the same region and of *B. jararaca* envenomation. However, a few cases of thrombocitopenia were observed in our study, contrary to what is observed in *B. jararaca* envenomation. Herein, we also observed for the first time that tissue factor could also be involved in the development of hemostatic disorders in *Bothrops* snakebite patients. Prospective studies are needed to elucidate the changes in platelet function in *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon and to measure the effect of other parameters involved in development of systemic bleeding, such as the serum hemorraghin levels.

Acknowledgements

We acknowledge all those patients and donors who participated in this study. We thank for the help during the research of the medical and nursing staff at *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado*. We also thank Socorro Costa for the technical support.

Funding

The study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD) Grant number 2992/2014; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ/UNIVERSAL) Grant number 428525/2016-4; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM/PPSUS) Grant number 287/2013. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Ana Maria Moura-da-Silva and Wuelton Marcelo Monteiro are CNPq fellows.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

1. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Nat Rev Dis Prim. 2017;3:17063.
2. Wen FH, Monteiro WM, Moura da Silva AM, Tambourgi D V., Mendonça da Silva I, Sampaio VS, et al. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(5):e0003701.
3. Campbell J, Lamar W. The venomous reptiles of the western hemisphere. New York: Ithaca; 2004. 376-80 p.
4. Alcântara JA, Bernarde PS, Sachett J, da Silva AM, Valente SF, Peixoto HM, et al. Stepping into a dangerous quagmire: Macroecological determinants of *Bothrops* envenomings, Brazilian Amazon. PLoS One [Internet]. 2018;13(12):e0208532. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0208532
5. Pardal PPO, Souza SM, Monteiro MRCC, França FOS, Tomy SC, Sano-Martins IS, et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98:28–42.
6. Oliveira S, Alves E, Santos A, Pereira J, Sarraff L, Nascimento E, et al. Factors Associated with Systemic Bleeding in *Bothrops* Envenomation in a Tertiary Hospital in the Brazilian Amazon. Toxins (Basel) [Internet]. 2019;11(1):22. Available from: http://www.mdpi.com/2072-6651/11/1/22
7. Sachett JAG, da Silva IM, Alves EC, Oliveira SS, Sampaio VS, do Vale FF, et al. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from Bothrops snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):1–21.
8. Mendonça-da-Silva I, Magela Tavares A, Sachett J, Sardinha JF, Zaparolli L, Gomes Santos MF, et al. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(11):1–21.

9. Kamiguti AS et al. Coagulopathy and Haemorrhage in Human Victims. Toxicon. 1991;29(8):961–72.
10. López-Lozano JL, De Sousa MV, Ricart CAO, Chávez-Olortegui C, Sanchez EF, Muniz EG, et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. Toxicon. 2002;40(7):997–1006.
11. Antunes TC, Yamashita KM, Barbaro KC, Saiki M, Santoro ML. Comparative analysis of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. Toxicon. 2010;56(8):1443–58.
12. Furtado MFD, Travaglia-Cardoso SR, Rocha MMT. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Toxicon. 2006;48(4):401–10.
13. Núñez V, Cid P, Sanz L, De La Torre P, Angulo Y, Lomonte B, et al. Snake venomics and antivenomics of *Bothrops atrox* venoms from Colombia and the Amazon regions of Brazil, Perú and Ecuador suggest the occurrence of geographic variation of venom phenotype by a trend towards paedomorphism. J Proteomics [Internet]. 2009;73(1):57–78. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2009.07.013
14. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. J Proteomics [Internet]. 2011;74(4):510–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003
15. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. J Proteomics [Internet]. 2017;159:32–46. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003
16. Salazar AM, Rodriguez-Acosta A, Girón ME, Aguilar I, Guerrero B. A comparative analysis of the clotting and fibrinolytic activities of the snake venom (Bothrops atrox) from different geographical areas in Venezuela. Thromb Res. 2007;120(1):95–104.
17. Sousa LF, Zdenek CN, Dobson JS, Op den Brouw B, Coimbra F, Gillett A, et al. Coagulotoxicity of Bothrops (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven

Venom Variation. Toxins (Basel). 2018;10(10).

18. Sousa LF, Nicolau C a., Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(9).
19. Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2001. 120 p.
20. Sano-Martins IS, Fan HW, Castro SCB, Tomy SC, Franca FOS, Jorge MT, et al. Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by Bothrops snakes. Toxicon. 1994;32(9):1045–50.
21. Warrell DA, Davidson NM, Greenwood BM, Ormerod LD, Pope HM, Watxins BJ, et al. Poisoning by bites of the saw-scaled orcarpetviper (*Echis carinates*) in Nigeria. Q Jl Med. 1977;46:33–62.
22. Warrell DA, Looareesuwan S, Theakston RDG, Phillips RE, Chanthavanich P, Virivan C, et al. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pitviper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. Am J trop Med Hyg. 1986;35:1235–47.
23. Denson KWE. Appendix 1. The preparation of general reagentes and coagulation factors. In: Biggs R, editor. Human blood Coagulation, haemostasis and thrombosis. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific; 1976. p. 661–2.
24. Denson KWE. Appendix 2. The preparation of general reagentes and coagulation factors. In: Biggs R, editor. Human Blood Coagulation Haemostadis and Thrombosis. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific; 1976. p. 702–4.
25. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. 1957;17:237–46.
26. Cardoso JLC, Fan HW, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenomsin the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. Q J Med. 1993;86:315–25.
27. Blomback B. Studies on the action of thrombic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. Ark Kemi. 1958;12:321.

28. Stocker K, Barlow GH. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). Methods Enzymol. 1976;45:214–23.
29. Petretski JH, Kanashiro M, Silva CP, Alves EW, Kipnis TL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. Brazilian J Med Biol Res. 2000;33(11):1293–300.
30. Hofmann H, Dumarey C, Bon C. Blood coagulation induced by *Bothrops atrox* venom: identification and properties of a factor X activator. Biochimie. 1983;65(3):201–10.
31. Hofmann H, Bon C. Blood Coagulation Induced by the Venom of *Bothrops* atrox. 2. Identification, Purification, and Properties of Two Factor X Activators. Biochemistry. 1987;26(3):780–7.
32. Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.
33. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. J Thromb Thrombolysis. 2003;16(1–2):17–20.
34. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. Toxicon [Internet]. 2012;60(1):70–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018
35. Rosing J, Govers-Riemslag JW, Yukelson L, Tans G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. Haemostasis. 2002;31(3–6):241–6.
36. Jern C, Eriksson E, Tengborn L, Risberg B, Wadenvik H, Jern S. Changes due to increased hepatic synthesis of these factors that may occur in stressful situations. Thromb Haemost. 1989;62(2):767–71.
37. Isbister GK, Maduwage K, Scorgie FE, Shahmy S, Mohamed F, Abeysinghe C, et al. Venom Concentrations and Clotting Factor Levels in a Prospective Cohort of Russell's Viper Bites with Coagulopathy. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2015;9(8):e0003968. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003968
38. Hoffman M, Monroe III DM. A Cell-based Model of Hemostasis. 2001;(7).
39. Acharya SS, Coughlin A, Dimichele DM, Jublirer SJ, Arden D, Anderson V, et al. Rare bleeding disorder registry: Deficiencies of factors II, V, VII, X, XIII, fibrinogen and dysfibrinogenemias. J Thromb Haemost. 2004;2(2):248–56.

40. Kamiguti AS, Matsunaga S, Spir M, Sano-Martins IS, Nahas L. Alterations of the blood coagulation system after accidental human inoculation by *Bothrops jararaca* venom. Brazilian J Med Biol Res. 1986;19:199–204.
41. Yamashita KM, Alves AF, Barbaro KC, Santoro ML. *Bothrops jararaca* Venom Metalloproteinases Are Essential for Coagulopathy and Increase Plasma Tissue Factor Levels during Envenomation. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(5).
42. Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG, et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2010;496(1):9–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.01.010
43. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases : biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon. 2005;45:997–1011.
44. Moretto Del-Rei TH, Sousa LF, Rocha MMT, Freitas-de-Sousa LA, Travaglia-Cardoso SR, Grego K, et al. Functional variability of *Bothrops atrox* venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. Toxicon [Internet]. 2019;164:61–70. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010119301138
45. Freitas-De-Sousa LA, Amazonas DR, Sousa LF, Sant'Anna SS, Nishiyama MY, Serrano SMT, et al. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. Biochimie. 2015;118:60–70.
46. Niewiarowski S, Kirby EP, Brudzynski TM, Stocker K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. Biochemistry. 1979;18(16):3570–7.
47. Read MS, Shermer RW, Brinkhous KM. Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(9):4514–8.
48. Rucinski B, Niewiarowski S, Holt JC, Soszka T, Knudsen K a. Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. Biochim Biophys Acta. 1990;1054(3):257–62.

49. Francischetti IMB, Castro HC, Zingali RB, Carlini CR, Guimarães JA. *Bothrops* sp. snake venoms: Comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. Comp Biochem Physiol - C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998;119(1):21–9.

50. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RDG, Warrell DA. Haematological evaluation of patients bitten by the *Bothrops jararaca*, in Brazil. Toxicon. 2008;51(8):1440–8.

51. Sousa LF, Nicolau C, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2013;7(9):e2442. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002442

52. Kamiguti, A.S.; Rugman, F.P.; Theakston, R.D.G.; Franca, F.O.S.; Ishii, H.; Hay CB. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. Thrombosis and Haemostasis. 1992;484–8.

3.3. Manuscrito científico 3 (redigido conforme normas da revista *Clinical Toxicology*, na qual se encontra em revisão):

Bothrops snakebites in the Amazon: Recovery from hemostatic disorders after Brazilian antivenom therapy

Sâmella Silva de Oliveira[a,b], Eliane Campos Alves[a,b], Alessandra dos Santos Santos[a], Elizandra Freitas do Nascimento[a], João Pedro Tavares Pereira[a], Iran Mendonça da Silva[a,b], Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett[a,b], Hiochelson Najibe dos Santos Ibiapina[a,b], Lybia Kássia Santos Sarraf[a], Jorge Carlos Contreras Bernal[a,b], Luciana Aparecida Freitas de Sousa[c], Mônica Colombini[c], Hedylamar Oliveira Marques[d], Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda[a], Ana Maria Moura-da-Silva[c], Hui Wen Fan[e], Luiz Carlos de Lima Ferreira[a], Ida Sigueko Sano-Martins[f,ϕ,*]and Wuelton Marcelo Monteiro[a,b,ϕ,*]

[a]*Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil;*[b] *Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil;*[c] *Laboratório de Imunopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil;*[d] *Laboratório de Hemostasia, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil;*[e]*Divisão Bioindustrial, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil,* [f]*Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil.*

[ϕ]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors

Wuelton Marcelo Monteiro, wueltonmm@gmail.com Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Av. Pedro Teixeira 25,Manaus 69040-000, Brazil.

Ida Sigueko Sano Martins, ida.sano@butantan.gov.br Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Av. Vital Brasil 1500, São Paulo 05503-900, Brazil

Abstract

Introduction: *Bothrops atrox* snakebites are a major public health problem in the Amazon region and also cause hemostatic disorders. In this study, we assessed the recovery from hemostatic disorders in *Bothrops* snakebite patients after being given antivenom therapy. **Methods:** This is a prospective study of *Bothrops* snakebite patients (n=100) treated at the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado*, Manaus, Brazilian Amazon, between January, 2016 and December, 2017**.** Blood samples were taken for the measurement of venom concentrations, platelets, clotting time and factors of patients on admission, 12, 24 and 48 hours after antivenom therapy, and taken again on discharge. The presence of systemic bleeding was recorded during the follow-up. **Results:** On admission, systemic bleeding was observed in 14% of the patients. Thrombocytopenia was noted in 10% of the patients. A total of 54% of the patients presented unclottable blood with low levels of fibrinogen and alpha 2-antiplasmin, and high levels of fibrin/fibrinogen degradation product (FDP) and D-dimers. Unclottable blood and systemic bleeding were overcome in most patients 12 hours after the antivenom therapy. Three patients developed systemic bleeding 48 hours after antivenom therapy. Levels of fibrinogen and alpha 2-antiplasmin, FDP and D-dimer returned to normal around 48 hours after the treatment or on discharge. The frequency of thrombocytopenia with high mean platelet volume increased in the first 24 hours after antivenom therapy, and decreased on discharge. *Bothrops* venom levels in patients decreased 12 hours after antivenom therapy and were not correlated with coagulation and fibrinolytic parameters. There were no deaths. **Conclusion:** Laboratorial parameters of coagulopathy returned to normal values within 48 hours after the antivenom therapy until discharge. A few patients still presented bleeding signs within 48 hours after beginning antivenom therapy. However, the Brazilian antivenom was able to overcome the hemostatic disorders in these cases of envenomation.

Keywords: *Bothrops atrox*; coagulopathy; systemic bleeding; thrombocytopenia; antivenom therapy.

Introduction

Snakebite envenomation has been classified by the World Health Organization as being part of the group of Neglected Tropical Diseases (1). In Brazilian Amazon rainforest environments there are *Bothrops* snakes such as *Bothrops atrox*, *B. bilineatus*, *B. brazili, B. marajoensis* and *B. taeniatus* (2,3). However, *B*. *atrox* is responsible for 90% of snakebites in this region (4), and these frequently result in local effects and systemic manifestations (5,6). Unclottable blood is the most common hemostatic disorder in *Bothrops* envenomations that occur in the Brazilian Amazon, followed by systemic bleeding and thrombocytopenia (6–9). Systemic bleeding and circulatory shock have been strongly associated with fatal snakebites in this region (10).

Antivenom is the only specific treatment available for snakebite envenomation (11) and, in Brazil, snakebite antivenom consists of $F(ab')_2$ fragments of neutralizing immunoglobulins obtained by fractionating the plasma of hyperimmunized horses with the toxins of snake venoms (12). *Bothrops* antigen used to immunize animals is composed of a pool of venoms from *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, and *B. jararacussu* (4).

Variability of snake venom has been observed between species and within a single species (13–18). Immunological cross-neutralization studies and clinical trials have been conducted to evaluate the efficacy of the *Bothrops* antivenom to treat envenomation induced by *B. atrox*, whose venom is not used in the production of *Bothrops* antivenom (6,19,20). The variability of *Bothrops* venom could affect the antivenom's efficacy, particularly the neutralization of venom toxins acting on blood coagulation, as previously shown in *in vitro* assays (14,20). Furthermore, there is limited information on recovery from hemostatic disorders after using antivenom therapy on *Bothrops* snakebite patients in this region (9). The aim of this study was to assess patient recovery from hemostatic disorders caused by *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon after providing antivenom therapy.

Methods

Study design

This study was carried out at the *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado* (FMT-HVD), Manaus, Brazilian Amazon, between January, 2016 and December, 2017. Patients with clinical–epidemiological diagnosis of *Bothrops* envenomation, no previous antivenom therapy in other health services and age >12 years were eligible to participate in this study. The snakes responsible by the envenomation, which were brought to the FMT-HVD by the patients, were identified by a trained biologist. This study was approved by the FMT-HVD Ethical Committee (approval number 1.302.174/2015). Written informed consent was obtained from the patients, their guardians in the case of minors, and volunteer donors.

Patients received *Bothrops* or *Bothrops-Lachesis* antivenom provided by the Brazilian Ministry of Health. Venoms used for production of the antivenoms are: *Bothrops* antivenom [(*Bothrops jararaca* (50.0%), *B. alternatus* (12.5%), *B. jararacussu* (12.5%), *B. moojeni* (12.5%) and *B. neuweidi* (12.5%)]; *Bothrops-Lachesis* antivenom [*Bothrops* genus (*Bothrops jararaca* (50.0%), *B. alternatus* (12.5%), *B. jararacussu* (12.5%), *B. moojeni* (12.5%) and *B. neuweidi* (12.5%)], and *Lachesis* genus [*L. muta* (100.0%)] (manufacturer's data). Antivenom was given to patients in a dosage corresponding to the clinical severity that was classified as follows: a) mild, characterized by pain and mild or absent local edema, mild or absent systemic bleeding, with or without coagulopathy; b) moderate, characterized by pain and evident edema involving three or more segments of the affected limb, accompanied or not by systemic bleeding and coagulopathy; c) severe, characterized by edema involving the entire affected limb, usually accompanied by severe pain, with or without coagulopathy. Cases involving systemic manifestations such as hypotension, shock, oliguria/anuria or severe bleeding were defined as severe cases, regardless of the local effect (21,22). A standard form was filled in with the clinical and epidemiological features of patients on admission and before beginning antivenom therapy (T0), at 12 (T12), 24 (T24) and 48 (T48) hours after beginning antivenom therapy and on discharge.

Laboratorial analysis

Patients' blood samples were collected at T0, T12, T24, T48 and on discharge. Clotting time was determined by the 20 min whole blood clotting test (23–25). Blood

was defined as unclottable when no clot was formed within 20 min and clottable when a solid or partial clot was formed within 20 min. Platelet counts and mean platelet volume (MPV) were carried out on samples containing potassium EDTA as the anticoagulant. 2% v/v *Bothrops-Lachesis* antivenom was added to the samples to neutralize *Bothrops* venom present in the sample, and counts were determined in an automated cell counter (Sysmex Corp., Kobe, Japan). Thrombocytopenia was defined by a platelet count below 150 $x10^9$/L. Low and high MPV were defined when values were below 7.4 fL and above 10.4 fL, respectively.

Clotting factor measurements were carried out on samples containing sodium citrate as the anticoagulant and 2% v/v *Bothrops-Lachesis* antivenom. Fibrinogen was measured based on the Clauss method (26) with an ACL TOP 300CTS coagulation analyzer (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain). Fibrin/fibrinogen degradation product (FDP) was determined qualitative and semi-quantitative by latex agglutination (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, France). D-Dimer was measured by immunoturbidimetry with an ACL TOP300 CTS coagulation analyser (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Spain). Alpha 2-antiplasmin was determined by the synthetic chromogenic substrate method (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, France). All assays were performed according to the manufacturer's protocol.

Venom-specific enzyme immune assay (EIA) was used to identify venom type (differentiating *Bothrops* from *Lachesis* venoms) and quantify venom and antivenom in serum samples according to Pardal et al. (6). Values were calculated using standard curves with known concentrations of venom or antivenom. The cut-off level corresponded to the mean plus 2 S.D. values of negative samples obtained from 14 volunteer donors, with no history of snakebite, who were accompanying the patients during hospitalization.

Data analysis

Two independent managers performed data entry using Microsoft Excel Office 365 software. Statistical analyses were made using the software GraphPad Prism version 5 (Graphpad Software, Inc., San Diego, USA) and STATA statistical package version

13 (Stata Corp, College Station, USA). The Mann–Whitney or Wilcoxon matched pairs tests were used for comparison of medians. Correlations between venom levels, clotting time and factors were tested with non-parametric Spearman correlation analysis. Statistical significance in results was considered when $p<0.05$.

Results

Patients' characterization

A total of 201 patients were assessed for eligibility, and 100 were included (Figure 1). Epidemiological and clinical information on admission is presented in Tables 1 and 2, respectively. Thirty-six patients brought the snake which had bitten them to the hospital and all the snakes were identified as *B. atrox*. On admission, unclottable blood was observed in 54 patients, systemic bleeding in 14 and thrombocytopenia in 10 (Table 2). Gingival bleeding was the most frequent form of systemic bleeding, followed by macrohematuria and ecchymosis (Table 3; Figure 2). No deaths were recorded (Table 2).

Hemostatic parameters

On admission, the median level of fibrinogen of the patients with clottable blood had decreased, although patients with unclottable blood presented significantly lower levels ($p<0.001$). Levels of FDP and D-dimer were normal in patients with clottable blood and significantly increased in patients with unclottable blood ($p<0.001$). Alpha 2-antiplasmin was also normal in patients with clottable blood and had significantly decreased in patients with unclottable blood ($p<0.001$). Regarding platelet counts on admission, there was no significant difference between patients with clottable and unclottable blood ($p=0.083$), both groups presented normal counts. Hypofibrinogenemia and high FDP levels recovered within 48 hours post treatment. The median level of D-dimer gradually decreased after antivenom therapy until moment of discharge. Patients showed low levels of alpha 2-antiplasmin on admission and at T24, however these returned to normal range on discharge (Figure 3).

Unclottable blood reverted to normal within 12 hours in most patients after beginning antivenom therapy. The frequency of thrombocytopenia and high MPV increased in the first 24 hours after beginning antivenom therapy, and decreased by the time of discharge. Systemic bleeding ceased generally within 12 hours after start of antivenom therapy (Figure 4). Three patients with systemic bleeding at T0 continued to bleed at, or after, T12 (Patients 27 - gingival bleeding/T12, hematemesis/T24 and conjunctival bleeding/T48; 51 and 95 - gingival bleeding/T12). Six patients without systemic bleeding at T0 started to bleed after antivenom therapy: two at T12 (Patients 64 and 66- ecchymosis distant from the bite site), one at T24 (Patient 82 - ecchymosis distant from the bite site) and three at T48 (Patients 12 and 100 – ecchymosis distant from the bite site; patient 7 - macrohematuria). All these patients presented ecchymosis in the proximal region of the bitten limb. Patient 7, suffering from macrohematuria at T48, already had 8 red blood cells/field at T24, however this manifestation ceased on discharge. All these patients had clottable blood and only three presented mild thrombocytopenia after antivenom therapy.

Antivenom and venom detection

Bothrops venom in levels above of the cut off value (18.87 ng/mL) was detected in the serum of 35 patients on admission. After antivenom therapy, venom levels in the serum of patients decreased at T12 and remained low until discharge (Figure 5A) except in 6 patients that presented venom levels slightly above the cut-off values. Notwithstanding, these patients did not show hemostatic disorders on discharge. Conversely, venom in the serum was not detected in patients with systemic bleeding at T48, and indeed there was no correlation between venom levels on admission and clotting time ($r=-0.119$, $p= 0.496$), fibrinogen ($r=-0.103$, $p=0.556$), D-dimer ($r=0.001$, $p=0.995$), alpha 2-antiplasmin ($r=-0.261$, $p=0.131$) and FDP levels ($r=-0.081$, $p=0.644$). We also observed high level of antivenom in patients at T12 which decreased over time, but remained detectable even on discharge as shown in Figure 5B.

Discussion

Our study shows that hemostatic disorders resulting from *Bothrops* envenomation in the Brazilian Amazon can lead to unclottable blood with low levels of fibrinogen and

alpha 2-antiplasmin and high levels FDP and D-dimer, systemic bleeding and a few cases of thrombocytopenia, which confirms a previous report from the Pará State, Brazil (6). *B. atrox* venom contains components with thrombin-like activity (29–31), and factor II (32), factor X (33), factor V (34) and factor XIII (35) activators, as well as components that induce fibrin(ogen)olysis (36). *In vitro*, *Bothrops* antivenom has shown better results in neutralizing prothrombin activation activity than the factor X activation activity of *B. atrox* venom (20). In the majority of our patients, the unclottable blood reverted to normal over 12 hours after beginning antivenom therapy, similarly to what has been found previously in relation the Amazon region (6) and in *B. jararaca* envenomation (37).

In *Bothrops* envenomation, hypofibrinogenemia returned to normal within 24 hours after beginning antivenom therapy (37). In our study, low fibrinogen and high FDP levels were almost totally normal within 24 hours after beginning antivenom therapy when compared to reference values. The median concentration of D-dimer on admission showed a gradual decrease after antivenom therapy. High D-dimer reported on admission suggests that intravascular thrombin formation contributes to the coagulation disorders in *Bothrops* snakebites in this region by converting fibrinogen to fibrin and activating factor XIII. Plasmin cleaves cross-linked fibrin by activating factor XIII and generates D-dimer (38). Inhibition of the fibrinolytic system at the plasmin level is a function exerted by alpha 2-antiplasmin (39). In our study, patients showed low levels of alpha 2-antiplasmin within the first 24 hours after antivenom therapy, indicating that its intravascular consumption is induced by plasmin formation (38,39). These levels returned to normal values on discharge, accompanied by normalization of fibrinogen and FDP levels.

Although various components isolated from *B. atrox* venom have been reported to act on platelets leading to thrombocytopenia or changes in platelet function (28,35,40,41), few cases of thrombocytopenia were observed in our study. However, platelet function was not evaluated. In *B. jararaca* envenomation, thrombocytopenia was observed in about half of the cases, and MPV returns to normal values within 6 hours of antivenom therapy (42). Interestingly, the frequency of thrombocytopenia and high MPV in our study increased in the first 24 hours after antivenom administration, though they decreased on discharge. Venom-induced oxidative stress could reduce

platelet count by apoptosis, which could explain the thrombocytopenia observed during hospitalization in our study (43,44). In a previous study in this region, on patient admission, a negative correlation was found between the platelet count and MPV, suggesting peripheral platelet destruction or activation in which the MPV tends to increase (9).

Systemic bleeding was observed in 20 patients in our study. Gingival bleeding, macrohematuria and ecchymosis were the most frequent forms of systemic bleeding. One case of central nervous system bleeding was observed. In a fatal case of a *Bothrops* snakebite with stroke, reported in the Brazilian Amazon, *Bothrops* venom was immunolocated in some areas of the patient's brain (45). It has been observed that systemic bleeding can occur in *Bothrops* snakebites patients even with clottable blood and normal platelet counts (9,46). In these cases, it is possible that metalloproteases may be inducing vascular damage, resulting in systemic bleeding (28,36,47). Actually, hemorrhagins from *Bothrops* venom cause systemic bleeding by their direct action on components of the basement membrane of capillaries (48,49). Serum hemorraghin levels were significantly higher in patients with systemic bleeding compared to those without bleeding in *B. jararaca* envenomation (48). Hemorraghin levels were not measured in our study.

Systemic bleeding in *B. jararaca* envenomation usually ceases a few hours after antivenom therapy (37). Although systemic bleeding was reverted within 12 hours after antivenom therapy in most of the patients in our study, bleeding was still observed at T48. It is possible that some systemic bleeding could appear clinically hours after envenomation, especially ecchymosis (50). Interestingly, all these cases of ecchymosis were noted in the proximal region of the bitten limb, which could be related to lymphatic drainage of venom, with extravasation into the perilymphatic tissue (51).

EIA detected *Bothrops* venom in only 35 of 100 clinically envenomed patients, probably because of the high cut-off values, meaning high background absorbance values obtained from volunteer donors. Therefore, probably, a more accurate specific monoclonal assay should be developed. Another explanation could be the retention of venom components in the bite site due to the affinity of toxins to tissues (52) or in the blister of patients (6). *Bothrops* venom levels in the serum of patients had decreased

in most patients at T12 and remained low until discharge, which demonstrates that the dose of antivenom administered was probably adequate. However, some patients showed *Bothrops* venom concentrations on discharges which were slightly above absorbance values in those donors without any hemostatic disorders at this time. Persistent venom levels after antivenom administration have been reported with other snakes, and were not associated with a recurrence of coagulopathy (53). Similarly, in our study there was no correlation between serum venom levels and clotting time as well as level of coagulation factors on admission or discharge. Thus, antivenom therapy produced a satisfactory response when considering the solution of the clinical signs of envenomation and hemostatic parameters. In addition, the levels of antivenom were detectable in the patient serum until time of discharge are shown here. Similarly, in a previous study, a high concentration of *Bothrops* antivenom was detected for 10 days after the treatment was given (54).

Conclusion

Unclottable blood and systemic bleeding were reverted in most patients at T12. Fibrinogen, alpha 2-antiplasmin, FDP and D-dimer levels returned to normal levels within 48 hours after the antivenom until discharge, and a few patients presented systemic bleeding at T48, but recovered by the time of discharge. The frequency of thrombocytopenia and high MPV increased in the first 24 hours after beginning antivenom, and decreased on discharge. Brazilian antivenom was able to overcome the hemostatic disorders in the envenomation from this region.

Acknowledgments

We are grateful to all patients and donors who participated in our study. We acknowledge the assistance of the medical and nursing staff at *Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado.* We also thank Socorro Costa for technical support.

Disclosure of interest

The authors report no conflict of interest.

Funding

This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROCAD) under Grant number 2992/2014; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ/UNIVERSAL) under Grant number 428525/2016-4; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM/PPSUS) under Grant number 287/2013.Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda, Ana Maria Moura-da-Silva and Wuelton Marcelo Monteiro are CNPq fellows.

References

1. Chippaux JP. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(6).
2. Alcântara JA, Bernarde PS, Sachett J, da Silva AM, Valente SF, Peixoto HM, et al. Stepping into a dangerous quagmire: Macroecological determinants of *Bothrops* envenomings, Brazilian Amazon. PLoS One [Internet]. 2018;13(12):e0208532. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0208532
3. de Oliveira SS, de Souza Sampaio V, de Almeida Gonçalves Sachett J, Campos Alves E, da Silva VC, Alcântara de Lima JA, et al. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology [Internet]. 2017. p. 1–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6288-6_61-2
4. Wen FH, Monteiro WM, Moura da Silva AM, Tambourgi D V., Mendonça da Silva I, Sampaio VS, et al. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon: Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(5):e0003701.
5. Alves EC, Gonc JDA, Sousa DDB, Oliveira S De, Nascimento F, Santos S, et al. Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center , Western Brazilian Amazon. 2018;01:1–16.
6. Pardal PPO, Souza SM, Monteiro MRCC, França FOS, Tomy SC, Sano-Martins IS, et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. Trans R Soc Trop

Med Hyg. 2004;98:28–42.

7. Sachett JAG, da Silva IM, Alves EC, Oliveira SS, Sampaio VS, do Vale FF, et al. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):1–21.
8. Mendonça-da-Silva I, Magela Tavares A, Sachett J, Sardinha JF, Zaparolli L, Gomes Santos MF, et al. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(11):1–21.
9. Oliveira S, Alves E, Santos A, Pereira J, Sarraff L, Nascimento E, et al. Factors Associated with Systemic Bleeding in *Bothrops* Envenomation in a Tertiary Hospital in the Brazilian Amazon. Toxins (Basel) [Internet]. 2019;11(1):22. Available from: http://www.mdpi.com/2072-6651/11/1/22
10. Souza AS, Sachett JAG, Alcântara JA, Freire M, Alecrim MGC, Lacerda M, et al. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. Toxicon [Internet]. 2018;145:15–24. Available from: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.041
11. Gutiérrez J. Global Availability of Antivenoms: The Relevance of Public Manufacturing Laboratories. Toxins (Basel) [Internet]. 2018;11(1):5. Available from: http://www.mdpi.com/2072-6651/11/1/5
12. Cardoso DF, Yamaguchi IK, Moura-da-Silva AM. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2nd ed. São Paulo: SARVIER; 2009. p. 419–31.
13. Furtado MFD, Travaglia-Cardoso SR, Rocha MMT. Sexual dimorphism in venom of *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae). Toxicon. 2006;48(4):401–10.
14. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. J Proteomics [Internet]. 2017;159:32–46. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003
15. Daltry JC, Wüster W, Thorpe RS. Diet and snake venom variation. Vol. 379, Nature. 1996. p. 537–40.

16. López-Lozano JL, De Sousa MV, Ricart CAO, Chávez-Olortegui C, Sanchez EF, Muniz EG, et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. Toxicon. 2002;40(7):997–1006.
17. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. J Proteomics [Internet]. 2011;74(4):510–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003
18. Chippaux JP, Whiliams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon. 1991;29(11):1279–303.
19. Sousa LF, Nicolau C, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2013;7(9):e2442. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002442
20. Sousa LF, Zdenek CN, Dobson JS, Op den Brouw B, Coimbra F, Gillett A, et al. Coagulotoxicity of Bothrops (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. Toxins (Basel). 2018;10(10).
21. Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2001. 120 p.
22. Brasil. Ministerio da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de vigilância em saúde. [Internet]. 2nd ed. Vol. 1. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 627–29 p. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf
23. Sano-Martins IS, Fan HW, Castro SCB, Tomy SC, Franca FOS, Jorge MT, et al. Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by *Bothrops* snakes. Toxicon. 1994;32(9):1045–50.
24. Warrell DA, Davidson NM, Greenwood BM, Ormerod LD, Pope HM, Watxins BJ,

et al. Poisoning by bites of the saw-scaled orcarpetviper (*Echis carinates*) in Nigeria. Q Jl Med. 1977;46:33–62.

25. Warrell DA, Looareesuwan S, Theakston RDG, Phillips RE, Chanthavanich P, Virivan C, et al. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pitviper (*Calloselasma rhodostoma*) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. Am J trop Med Hyg. 1986;35:1235–47.
26. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. 1957;17:237–46.
27. Sousa L, Nicolau C, Peixoto P, Bernardoni J, Oliveira S, Portes-Junior J, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(9):1–16.
28. Freitas-De-Sousa LA, Amazonas DR, Sousa LF, Sant'Anna SS, Nishiyama MY, Serrano SMT, et al. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. Biochimie. 2015;118:60–70.
29. Blomback B. Studies on the action of thrombic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. Ark Kemi. 1958;12:321.
30. Stocker K, Barlow GH. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (Batroxobin). Methods Enzymol. 1976;45:214–23.
31. Petretski JH, Kanashiro M, Silva CP, Alves EW, Kipnis TL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. Brazilian J Med Biol Res. 2000;33(11):1293–300.
32. Hofmann H, Bon C. Blood Coagulation Induced by the Venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, Purification, and Properties of a Prothrombin Activator. Biochemistry. 1987;26(3):772–80.
33. Hofmann H, Bon C. Blood Coagulation Induced by the Venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, Purification, and Properties of Two Factor X Activators. Biochemistry. 1987;26(3):780–7.
34. Rosing J, Govers-Riemslag JW, Yukelson L, Tans G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. Haemostasis. 2002;31(3–6):241–6.
35. Niewiarowski S, Kirby EP, Brudzynski TM, Stocker K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-

clotting factors. Biochemistry. 1979;18(16):3570–7.

36. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. Toxicon [Internet]. 2012;60(1):70–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018
37. Cardoso JLC, Fan HW, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenomsin the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. Q J Med. 1993;86:315–25.
38. Bates SM, MSc M. D-dimer assays in diagnosis and management of thrombotic and bleeding disorders. Semin Thromb Hemost. 2012;38(7):673–82.
39. Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.
40. Rucinski B, Niewiarowski S, Holt JC, Soszka T, Knudsen K a. Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. Biochim Biophys Acta. 1990;1054(3):257–62.
41. Read MS, Shermer RW, Brinkhous KM. Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(9):4514–8.
42. Santoro ML, Sano-Martins IS, Fan HW, Cardoso JL, Theakston RDG, Warrell D a. Haematological evaluation of patients bitten by *Bothrops jararaca*, in Brazil. Toxicon. 2008;51(8):1440–8.
43. Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, Santhosh MS, Sundaram MS, Kemparaju K, et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. Toxicon [Internet]. 2015;98(February):89–97. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.014
44. Strapazzon J de O, Parisotto EB, Moratelli AM, Garlet TR, Bastos J, Zimermann IR, et al. Systemic oxidative stress in victims of *Bothrops* snakebites. J Appl Biomed [Internet]. 2015;13(2):161–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jab.2014.11.002
45. Oliveira SS, Freitas-de-Sousa LA, Alves EC, Ferreira LCL, Mendonça-da-Silva I, Lacerda MVG, et al. Fatal stroke after *Bothrops* snakebite in the Amazonas

state, Brazil: A case report. Toxicon [Internet]. 2017;138:102–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.021

46. Kamiguti AS et al. Coagulopathy and Haemorrhage in Human Victims. Toxicon. 1991;29(8):961–72.
47. Sanchez EF, Schneider FS, Yarleque A, Borges MH, Richardson M, Figueiredo SG, et al. The novel metalloproteinase atroxlysin-I from Peruvian *Bothrops atrox* (Jergón) snake venom acts both on blood vessel ECM and platelets. Arch Biochem Biophys [Internet]. 2010;496(1):9–20. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2010.01.010
48. Kamiguti AS, Rugman FP, Theakston RDG, França FOS, Ishii H, Hay C, et al. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. Thromb Haemost. 1992;67(4):484–8.
49. Gutiérrez JM, Rucavado A, Escalante T, Díaz C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases : biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. Toxicon. 2005;45:997–1011.
50. Epperla N, Mazza JJ, Yale SH. A review of clinical signs related to ecchymosis. WMJ. 2015;114(2):61–6.
51. Roberts JR, Greenberg MI. Ascending Hemorrhagic Signs after a Bite from a Copperhead. N Engl J Med. 1997;336(17):1262–3.
52. Baldo C, Jamora C, Yamanouye N, Zorn TN, Moura-da-Silva AM. Mechanisms of vascular danage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. PLoS Negl Trop Dis. 2010;4(6):1–10.
53. Maduwage K, O'Leary MA, Scorgie FE, Shahmy S, Mohamed F, Abeysinghe C, et al. Detection of Venom after Antivenom Is Not Associated with Persistent Coagulopathy in a Prospective Cohort of Russell's Viper (*Daboia russelii*) Envenomings. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8(12):6–12.
54. Theakston RD, Fan HW, Warrell DA, Da Silva WD, Ward SA, Higashi HG. Use of enzyme immunoassays to compare the effect and assess the dosage regimens of three Brazilian *Bothrops* antivenoms. The Butantan Institute Antivenom Study Group (BIASG). Am J Trop Med Hyg. 1992;47(5):593–604.

Table 1. Background information of *Bothrops* snakebite patients on admission.

Characteristics	Number of patients
Gender	
Male:female	88:22
Age (median) years (range)	42 (14 – 79)
Area of occurrence	
Rural:urban	92:8
Work-related bite	46
Rural worker	52
Time-interval to medical assistance (hours)	
<3	46
3-6	34
>6	20
Anatomical location of bite	
Foot	73
Leg	19
Hand	8
Pre-hospital treatment	
Tourniquets	24
Local incisions	4
Suction	1
Topical/oral medicines	55
***Bothrops* bite confirmation**	
Snake identification only	20
Snake identification + EIA	16
EIA only	19
Clinical-epidemiological diagnosis only	45

Table 2. Clinical features and comorbidities of *Bothrops* snakebite patients on admission.

Variable	Number of patients
Local manifestations	
Swelling	99
Pain	97
Bleeding from fang punctures	45
Lymphadenopathy	31
Ecchymosis	20
Redness	10
Blistering	4
Paresthesia	3
Necrosis	1
Systemic alterations related to hemostasis	
Unclottable blood	54
Bleeding	14
Thrombocytopenia (platelet count <150 $x10^9$/L)	10
Other systemic manifestations	
Headache	37
Nausea	31
Vomiting	19
Dizziness	6
Blurred vision	3
Sweating	3
Abdominal pain	3
Diarrhoea	2
Comorbidities	
Arterial hypertension	16
Diabetes	6
Cardiopathy	1
Clinical severity of envenomation	
Mild	27
Moderate	59

Severe	14
Median dose of antivenom (vials) (range)	8 (3-12)
Type of antivenom	
Bothrops	97
Bothrops-Lachesis	3
Median length of hospital stay (days) (range)	4 (1-24)
Outcome	
Discharged	100

Table 3. Systemic bleeding observed in *Bothrops* snakebite patients on admission and during hospitalization.

Description	Number of patients
Systemic bleeding	20/100
Gingival	9
Macrohematuria	7
Ecchymosis	6
Hematemesis	3
Hemoptysis	2
Epistaxis	1
Conjunctival	1
Central Nervous System	1

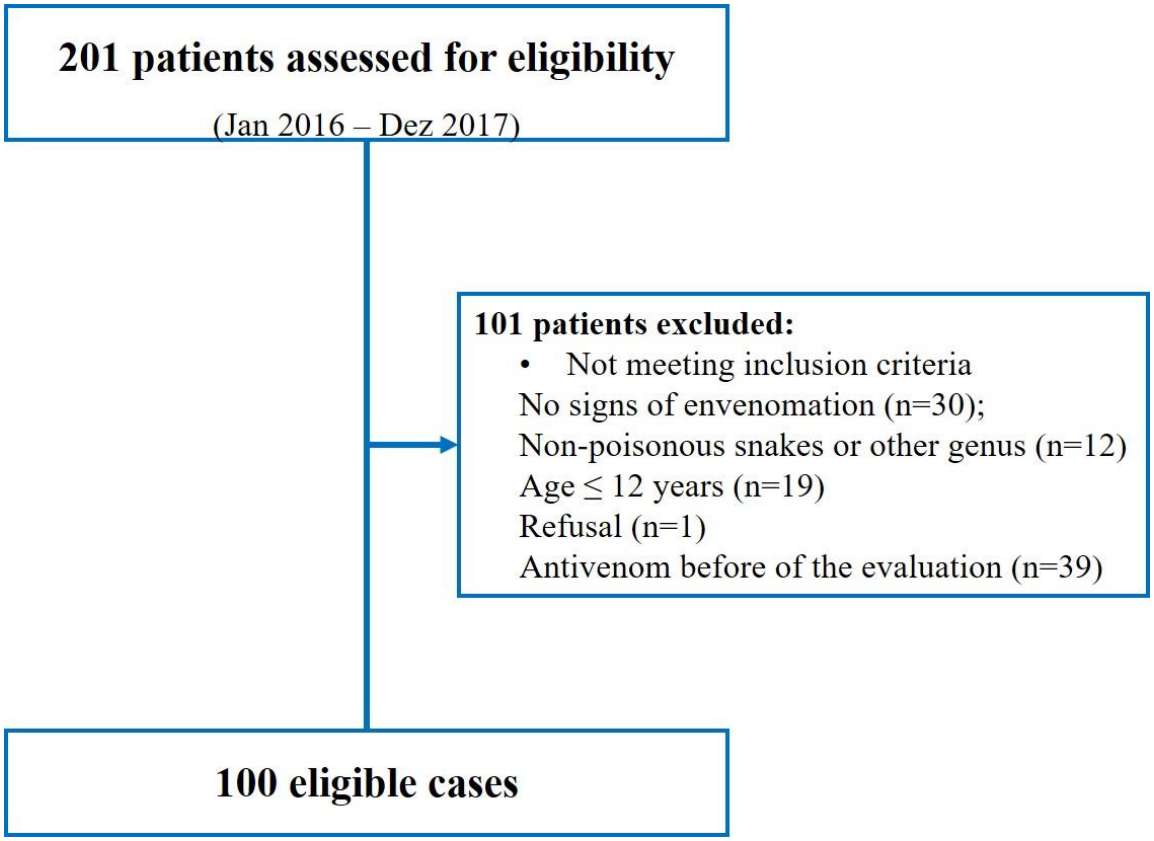


Figure 1. Flowchart for the inclusion of *Bothrops* envenomation in our study.

Figure 2. Systemic bleeding after *Bothrops* envenomation in the Brazilian Amazon. Gingival bleeding an hour and a half after the snakebite by a juvenile female *B. atrox* which ceased after 12 hours of the antivenom therapy (A) and this same patient presented conjunctival bleeding 48 hours after treatment and received additional dose of antivenom which ceased bleeding (B); Patient was bitten on left foot (arrow); ecchymosis was observed on left leg 12 hours of starting treatment (C).

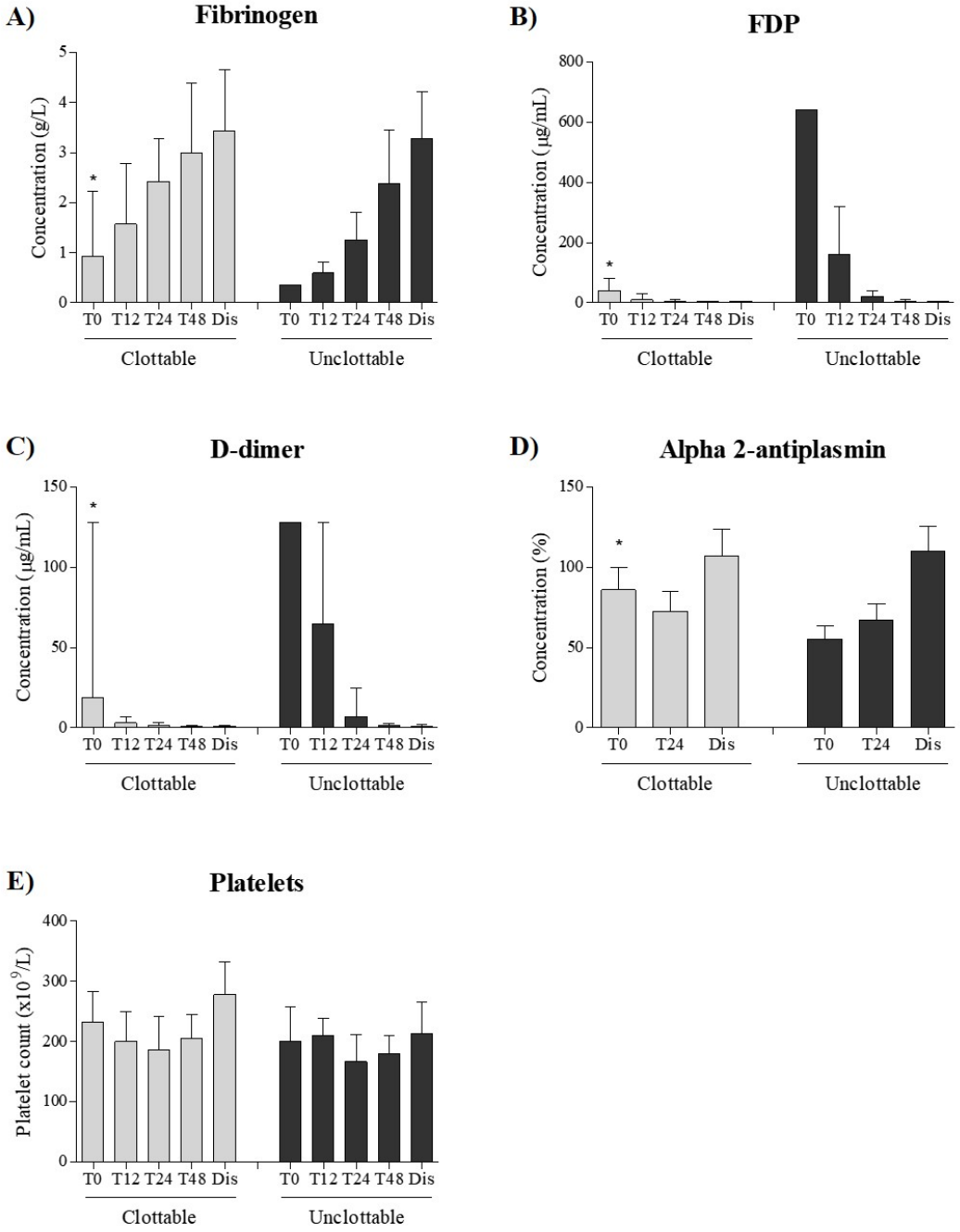


Figure 3. Plasma concentration of fibrinogen (A), FDP (B), D-dimer (C), alpha 2-antiplasmin (D) and platelet count (E) on admission and before antivenom therapy (T0), and at 12 (T12), 24 (T24) and 48 (T48) hours after antivenom therapy and on discharge (Dis) in patients with clottable vs. unclottable blood on admission. Results are expressed as medians and interquartile ranges. *p<0.001 compared with results at T0 in patients with unclottable blood. FDP: fibrin/fibrinogen degradation product. Reference values: fibrinogen = 2.38-4.98 g/L; FDP < 5µg/mL; D-dimer ≤ 0.5 ng/mL; alpha 2-antplasmin = 80-120%; platelet count = 150-450 x10^9/L.

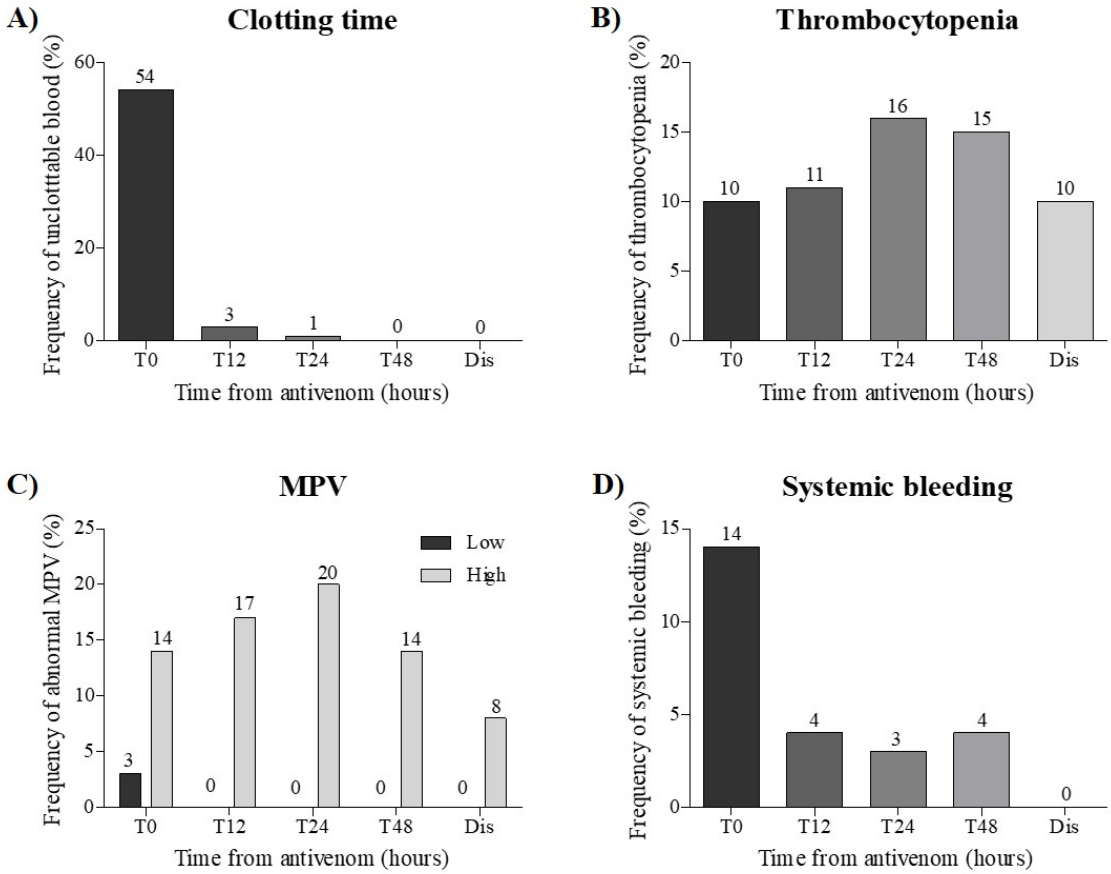


Figure 4. Frequency of the unclottable blood (A), thrombocytopenia (platelet count <150,000/μL) (B), abnormal mean platelet volume, low (<7.4 fL) and high (>10.4 fL) (C) and systemic bleeding (D) on admission and before antivenom therapy (T0), and at 12 (T12), 24 (T24) and 48 (T48) hours after antivenom therapy and on discharge (Dis). MPV: mean platelet volume.

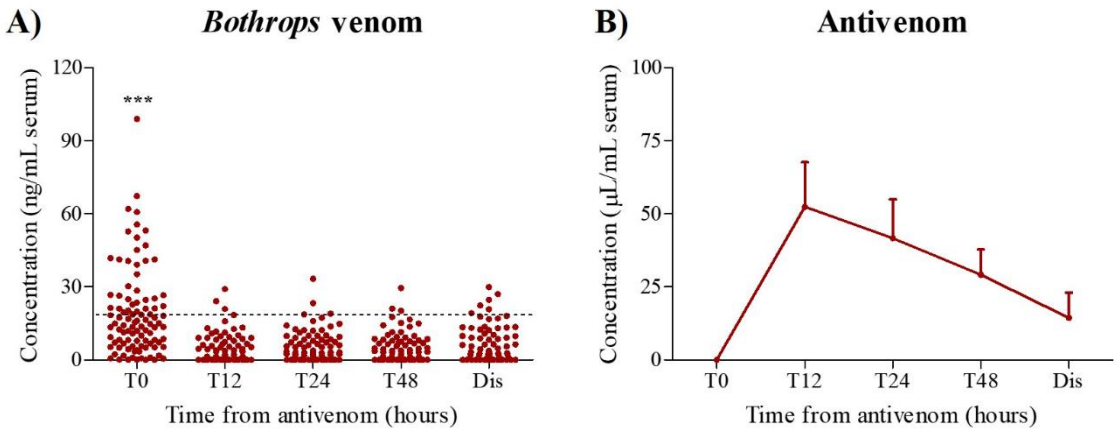


Figure 5. *Bothrops* venom (A) and antivenom (B) levels in sera of patients on admission and before antivenom therapy (T0), and at 12 (T12), 24 (T24) and 48 (T48) hours after antivenom therapy and on discharge (Dis). Horizontal line corresponds to the cut-off level corresponding to the mean plus 2 S.D. values of negative samples for *Bothrops* venom obtained from volunteer donors. *p<0.001 compared with results of venom levels from other times. All serum samples of volunteer donors showed negative results for antivenom detection. Results for antivenom detection are expressed as medians and interquartile ranges.

4. LIMITAÇÕES DA PESQUISA E PERSPECTIVAS

É possível que o registro incompleto das variáveis analisadas para identificar os fatores associados aos sangramentos sistêmicos após o acidente botrópico nos prontuários eletrônicos do sistema *iDoctor* influencie na qualidade e resultados dos dados obtidos. Outro limitante da pesquisa foi que não foram avaliadas as mudanças na função plaquetária induzidas pelo veneno botrópico, uma vez que a frequência de trombocitopenia nos acidentes botrópicos nesta parte da Amazônia brasileira é baixa, nem o estresse oxidativo induzido pelo veneno, o qual poderia explicar o aumento da frequência de trombocitopenia após a administração do antiveneno. Além disso, os níveis de hemorragina não foram dosados nos pacientes. Esses fatores também poderiam estar associados com a presença de sangramentos sistêmicos observados nesses acidentes.

As perspectivas futuras para a continuação desta pesquisa são:

i) a realização de estudos sobre a caracterização da atividade do veneno de serpentes *B. atrox* provenientes de Manaus sobre as plaquetas, e a avaliação da função plaquetária em vítimas de acidentes botrópicos na Amazônia brasileira. A avaliação da função plaquetária em acidentes causados por *B. jararaca* mostra que na maioria dos pacientes há uma diminuição da agregação plaquetária em sangue total induzida por ADP e ristocetina, enquanto por colágeno em apenas 35% dos pacientes (70);

ii) a avaliação do estresse oxidativo induzido pelo veneno em vítimas de acidentes botrópicos na Amazônia brasileira antes e após a administração do antiveneno. O estresse oxidativo aumentado induzido pela atividade do veneno poderia estimular a apoptose das plaquetas levando a trombocitopenia. Os antivenenos utilizados no tratamento dos acidentes ofídicos são inefetivos contra o estresse oxidativo induzido pelo veneno (71);

iii) a determinação dos níveis de hemorragina sérico e trombomodulina em vítimas de acidentes botrópicos na Amazônia brasileira. Em acidentes causados por *B. jararaca*, os níveis de hemorragina sérico foram elevados em pacientes com

sangramentos sistêmicos e inversamente correlacionados com a contagem plaquetária nestes pacientes (48);

iv) a avaliação das alterações no tempo de coagulação e níveis de fatores de coagulação em vítimas de acidentes causados por serpentes *B. atrox* jovens e adultas nesta parte da Amazônia brasileira. Em ensaios *in vitro* foram observadas diferenças no perfil proteico de *B. atrox* da região de Manaus de acordo com o estágio ontogenético da serpente, e que a atividade coagulante sobre o plasma humano de venenos de serpentes *B. atrox* jovens foi maior do que a de adultas (68). Dessa forma, faz-se necessário também a avaliação da recuperação das alterações do tempo de coagulação e dos níveis de fatores de coagulação induzidas pelo veneno de serpentes *B. atrox* jovens e adultas após a administração do antiveneno.

5. CONCLUSÕES

- A frequência de sangramentos sistêmicos nos acidentes botrópicos nesta parte da Amazônia brasileira foi semelhante àquela observada em outras partes da Amazônia, mas menor do que a encontrada em acidentes causados por *B. jararaca*;

- A trombocitopenia e a incoagulabilidade sanguínea presentes na admissão dos pacientes foram associadas independentemente com o risco de desenvolvimento de sangramento sistêmico após o acidente botrópico;

- A incoagulabidade sanguínea nos acidentes botrópicos foi caracterizada por baixos níveis de FV, FII, fibrinogênio, plasminogênio e alfa 2- antiplasmina, e níveis elevados de fator tissular, PDF e D-dímero; os níveis de FVII e FX e a contagem plaquetária encontraram-se dentro dos limites de normalidade. Essas características foram também observadas em pacientes com sangramentos sistêmicos;

- As mudanças nos níveis de fatores de coagulação foram semelhantes àquelas observadas em acidentes botrópicos ocorridos em outras partes da Amazônia e em acidentes causados por *B. jararaca*. No entanto, poucos casos de trombocitopenia foram observados, ao contrário do encontrado em acidentes por *B. jararaca*;

- O antiveneno foi capaz de recuperar os distúrbios hemostáticos nos acidentes botrópicos nesta parte da Amazônia brasileira.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chippaux JP. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(6).
2. Gutiérrez JM, Calvete JJ, Habib AG, Harrison RA, Williams DJ, Warrell DA. Snakebite envenoming. Nat Rev Dis Prim. 2017;3:17063.
3. Harrison RA, Hargreaves A, Wagstaff SC, Faragher B, Lalloo DG. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(12):e569.
4. Brasil. Ministerio da Saúde. Acidente por animais peçonhentos- Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2019.
5. Brasil. Acidentes por animais peçonhentos. In: Saúde M da SS de V em, editor. Guia de vigilância epidemiológica. 7ª. Brasília; 2009. p. 1–6.
6. Feitosa E, Sampaio V, Salinas J, Queiroz A, da Silva I, Gomes A, et al. Older age and time to medical assistance are associated with severity and mortality of snakebites in the Brazilian Amazon: A Case-Control Study. PLoS One. 2015;10(7):1–15.
7. da Silva Souza A, de Almeida Gonçalves Sachett J, Alcântara JA, Freire M, Alecrim M das GC, Lacerda M, et al. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. Toxicon [Internet]. 2018;145(February):15–24. Available from: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.041
8. Alcântara JA, Bernarde PS, Sachett J, da Silva AM, Valente SF, Peixoto HM, et al. Stepping into a dangerous quagmire: Macroecological determinants of *Bothrops* envenomings, Brazilian Amazon. PLoS One [Internet]. 2018;13(12):e0208532. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0208532
9. Souza AS, Sachett JAG, Alcântara JA, Freire M, Alecrim MGC, Lacerda M, et al. Snakebites as cause of deaths in the Western Brazilian Amazon: Why and who dies? Deaths from snakebites in the Amazon. Toxicon [Internet]. 2018;145:15–24. Available from: https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.02.041
10. Wen FH, Monteiro WM, Moura da Silva AM, Tambourgi D V., Mendonça da Silva I, Sampaio VS, et al. Snakebites and Scorpion Stings in the Brazilian Amazon:

Identifying Research Priorities for a Largely Neglected Problem. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(5):e0003701.

11. de Oliveira SS, de Souza Sampaio V, de Almeida Gonçalves Sachett J, Campos Alves E, da Silva VC, Alcântara de Lima JA, et al. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. In: IUPAC Compendium of Chemical Terminology [Internet]. 2017. p. 1–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6288-6_61-2
12. Pardal PPO, Souza SM, Monteiro MRCC, França FOS, Tomy SC, Sano-Martins IS, et al. Clinical trial of two antivenoms for the treatment of *Bothrops* and *Lachesis* bites in the north eastern Amazon region of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2004;98:28–42.
13. Campbell J, Lamar W. The venomous reptiles of the western hemisphere. New York: Ithaca; 2004. 376-80 p.
14. Oliveira ME, Martins M. When and where to find a pitviper: activity patterns and habitat use of the lancehead, *Bothrops atrox*, in central Amazonia, Brazil. Herpetol Nat Hist. 2001;8(2):101–10.
15. Turci LCB, Albuquerque S De, Bernarde PS, Miranda DB. Uso do hábitat, atividade e comportamento de *Bothriopsis bilineatus* e de *Bothrops atrox* (Serpentes: Viperidae) na floresta do Rio Moa, Acre, Brasil. Biota Neotrop. 2009;9(3):197–206.
16. Bernarde PS, Gomes JDO. Venomous snakes and ophidism in Cruzeiro do Sul, Alto Juruá, State of Acre, Brazil. Acta Amaz [Internet]. 2012;42(1):65–72. Available from: http://www.scielo.br/pdf/aa/v42n1/a08v42n1.pdf
17. Sachett JAG, da Silva IM, Alves EC, Oliveira SS, Sampaio VS, do Vale FF, et al. Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(7):1–21.
18. Alves EC, Gonc JDA, Sousa DDB, Oliveira S De, Nascimento F, Santos S, et al. Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center , Western Brazilian Amazon. 2018;01:1–16.
19. Cardoso JLC, Fan HW, França FOS, Jorge MT, Leite RP, Nishioka SA, et al. Randomized comparative trial of three antivenomsin the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. Q J Med. 1993;86:315–25.

20. Brasil. Ministerio da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de vigilância em saúde. [Internet]. 2nd ed. Vol. 1. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 627–29 p. Available from: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf
21. Málaque CMS, Gutiérrez JM. Snabebite envenomation in Central and South America. In: Brent J, editor. Critical Care Toxicology [Internet]. Switzerland: Springer International; 2015. p. 1–22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-17900-1
22. Machado AS, Barbosa FB, da Mello GS, de Pardal PP de O. Acidente vascular cerebral hemorrágico associado à acidente ofídico por serpente do gênero *Bothrops*: Relato de caso. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(5):602–4.
23. de Oliveira Pardal PP, da Silva Pinheiro ACJ, Cunha Silva CT, Santos PRSG, da Costa Gadelha MA. Hemorrhagic stroke in children caused by *Bothrops marajoensis* envenoming: A case report. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2015;21(1).
24. Oliveira SS, Freitas-de-Sousa LA, Alves EC, Ferreira LCL, Mendonça-da-Silva I, Lacerda MVG, et al. Fatal stroke after *Bothrops* snakebite in the Amazonas state, Brazil: A case report. Toxicon [Internet]. 2017;138:102–6. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.08.021
25. França FOS, Málaque CMS. Acidente botrópico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr. V, editors. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2nd ed. São Paulo: Sarvier; 2009. p. 81–95.
26. Cardoso DF, Yamaguchi IK, Moura-da-Silva AM. Produção de soros antitoxinas e perspectivas de modernização por técnicas de biologia molecular. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Haddad Jr V, editors. Animais Peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. 2nd ed. São Paulo: SARVIER; 2009. p. 419–31.
27. Mendonça-da-Silva I, Magela Tavares A, Sachett J, Sardinha JF, Zaparolli L, Gomes Santos MF, et al. Safety and efficacy of a freeze-dried trivalent antivenom for snakebites in the Brazilian Amazon: An open randomized controlled phase IIb clinical trial. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(11):1–21.

28. Brasil. Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica; 2001. 120 p.
29. Muniz EG, Maria WS, Estevão-Costa MI, Buhrnheim P, Chávez-Olórtegui C. Neutralizing potency of horse antibothropic Brazilian antivenom against *Bothrops* snake venoms from the Amazonian rain forest. Toxicon. 2000;38(12):1859–63.
30. Furtado MDFD, Cardoso ST, Soares OE, Pereira A Pietro, Fernandes DS, Tambourgi DV, et al. Antigenic cross-reactivity and immunogenicity of *Bothrops* venoms from snakes of the Amazon region. Toxicon. 2010;55(4):881–7.
31. Sousa LF, Nicolau C, Peixoto PS, Bernardoni JL, Oliveira SS, Portes-Junior JA, et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of Bothrops Complex. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2013;7(9):e2442. Available from: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002442
32. Santos Barreto GNL, de Oliveira SS, dos Anjos IV, Chalkidis H de M, Mourão RHV, Moura-da-Silva AM, et al. Experimental *Bothrops atrox* envenomation: Efficacy of antivenom therapy and the combination of *Bothrops* antivenom with dexamethasone. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(3).
33. Moretto Del-Rei TH, Sousa LF, Rocha MMT, Freitas-de-Sousa LA, Travaglia-Cardoso SR, Grego K, et al. Functional variability of *Bothrops atrox* venoms from three distinct areas across the Brazilian Amazon and consequences for human envenomings. Toxicon [Internet]. 2019;164:61–70. Available from: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010119301138
34. Sousa LF, Portes-Junior JA, Nicolau CA, Bernardoni JL, Nishiyama-Jr MY, Amazonas DR, et al. Functional proteomic analyses of *Bothrops atrox* venom reveals phenotypes associated with habitat variation in the Amazon. J Proteomics [Internet]. 2017;159:32–46. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.03.003
35. Gale AJ. Current Understanding of Hemostasis. Toxicol Pathol [Internet]. 2011 Jan 30;39(1):273–80. Available from: http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0192623310389474
36. Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice.

5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.

37. Hoffman M. Remodeling the blood coagulation cascade. J Thromb Thrombolysis. 2003;16(1–2):17–20.
38. Monkovic DD, Tracy PB, Tracy PB. Activation of Human Factor V by Factor Xa and Thrombin. Biochemistry. 1990;29(5):1118–28.
39. Hoffman M, Monroe III DM. A Cell-based Model of Hemostasis. 2001;(7).
40. Ferreira CN, Sousa MO, Dusse LMS, Carvalho MG. O novo modelo da cascata de coagulação baseado nas superfícies celulares e suas implicaçoes. Rev Bras Hematol Hemoter [Internet]. 2010;32(5):416–421 Retiado em 2012–06–10 de. Available from: http://www.scielo.br/pdf/rbhh/v32n5/aop101010.pdf
41. Smith S a. The cell-based model of coagulation: State-Of-The-Art Review. J Vet Emerg Crit Care. 2009;19(1):3–10.
42. Tu a T, Homma M. Toxicologic study of snake venoms from Costa Rica. Toxicol Appl Pharmacol. 1970;16(1):73–8.
43. Kardong K V. The evolution of the venom apparatus in snakes from colubrids to Viperids & Elapids. Memórias do Inst Butatan. 1982;46:105–18.
44. Kini RM, Koh CY. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. Toxins (Basel). 2016;8(10):1–27.
45. Sajevic T, Leonardi A, Križaj I. Haemostatically active proteins in snake venoms. Toxicon. 2011;57(5):627–45.
46. Sano-Martins IS, Santoro ML. Distúrbios hemostáticos em envenenamentos por animais peçonhentos no Brasil. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMS, Junior VH, editors. o Brasil: biologia, clínica e terapêutica. 2nd ed. São Paulo: SARVIER; 2009. p. 331–51.
47. Kamiguti AS, Cardoso JLC. Haemostatic changes caused by the venoms of South American snakes. Toxicon. 1989;27(9):955–63.
48. Kamiguti AS, Rugman FP, Theakston RDG, França FOS, Ishii H, Hay C, et al. The role of venom haemorrhagin in spontaneous bleeding in *Bothrops jararaca* envenoming. Thromb Haemost. 1992;67(4):484–8.
49. White J. Snake venoms and coagulopathy. Toxicon. 2005;45(8):951–67.
50. Blomback B. Studies on the action of thrombic enzymes on bovine fibrinogen as measured by N-terminal analysis. Ark Kemi. 1958;12:321.
51. Stocker K, Barlow GH. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom

(Batroxobin). Methods Enzymol. 1976;45:214–23.

52. Petretski JH, Kanashiro M, Silva CP, Alves EW, Kipnis TL. Two related thrombin-like enzymes present in *Bothrops atrox* venom. Brazilian J Med Biol Res. 2000;33(11):1293–300.
53. Hofmann H, Bon C. Blood Coagulation Induced by the Venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, Purification, and Properties of a Prothrombin Activator. Biochemistry. 1987;26(3):772–80.
54. Hofmann H, Bon C. Blood Coagulation Induced by the Venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, Purification, and Properties of Two Factor X Activators. Biochemistry. 1987;26(3):780–7.
55. Niewiarowski S, Kirby EP, Brudzynski TM, Stocker K. Thrombocytin, a serine protease from *Bothrops atrox* venom. 2. Interaction with platelets and plasma-clotting factors. Biochemistry. 1979;18(16):3570–7.
56. Rosing J, Govers-Riemslag JW, Yukelson L, Tans G. Factor V activation and inactivation by venom proteases. Haemostasis. 2002;31(3–6):241–6.
57. Cintra ACO, De Toni LGB, Sartim MA, Franco JJ, Caetano RC, Murakami MT, et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. Toxicon [Internet]. 2012;60(1):70–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.018
58. Jacob-Ferreira AL, Menaldo DL, Bernardes CP, Sartim M a., De Angelis CD, Tanus-Santos JE, et al. Evaluation of the in vivo thrombolytic activity of a metalloprotease from *Bothrops atrox* venom using a model of venous thrombosis. Toxicon. 2016;109:18–25.
59. Rucinski B, Niewiarowski S, Holt JC, Soszka T, Knudsen K a. Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. Biochim Biophys Acta. 1990;1054(3):257–62.
60. Read MS, Shermer RW, Brinkhous KM. Venom coagglutinin: an activator of platelet aggregation dependent on von Willebrand factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(9):4514–8.
61. Freitas-De-Sousa LA, Amazonas DR, Sousa LF, Sant'Anna SS, Nishiyama MY, Serrano SMT, et al. Comparison of venoms from wild and long-term captive *Bothrops atrox* snakes and characterization of Batroxrhagin, the predominant class PIII metalloproteinase from the venom of this species. Biochimie.

2015;118:60–70.

62. Freitas-de-sousa LA, Colombini M, Lopes-Ferreira M, Serrano SMT, Moura-da-silva AM. Insights into the mechanisms involved in strong hemorrhage and dermonecrosis induced by atroxlysin-Ia, a PI-class snake venom metalloproteinase. Toxins (Basel). 2017;9(8).
63. Patiño AC, Pereañez J a., Núñez V, Benjumea DM, Fernandez M, Rucavado A, et al. Isolation and biological characterization of Batx-I, a weak hemorrhagic and fibrinogenolytic PI metalloproteinase from Colombian *Bothrops atrox* venom. Toxicon [Internet]. 2010;56(6):936–43. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.06.016
64. Petretski JH, Kanashiro MM, Rodriques FG, Alves EW, Machado OLT, Kipnis TL. Purification and Identification of A 25 KDa Hemorrhagin from *B. atrox* Venom. Protein Pept Lett. 2001;8(3):187–92.
65. Francischetti IMB, Castro HC, Zingali RB, Carlini CR, Guimarães JA. *Bothrops* sp. snake venoms: Comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. Comp Biochem Physiol - C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1998;119(1):21–9.
66. Chippaux JP, Whiliams V, White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. Toxicon. 1991;29(11):1279–303.
67. Calvete JJ, Sanz L, Pérez A, Borges A, Vargas AM, Lomonte B, et al. Snake population venomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. J Proteomics [Internet]. 2011;74(4):510–27. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.01.003
68. López-Lozano JL, De Sousa MV, Ricart CAO, Chávez-Olortegui C, Sanchez EF, Muniz EG, et al. Ontogenetic variation of metalloproteinases and plasma coagulant activity in venoms of wild *Bothrops atrox* specimens from Amazonian rain forest. Toxicon. 2002;40(7):997–1006.
69. Sousa LF, Zdenek CN, Dobson JS, Op den Brouw B, Coimbra F, Gillett A, et al. Coagulotoxicity of *Bothrops* (Lancehead Pit-Vipers) Venoms from Brazil: Differential Biochemistry and Antivenom Efficacy Resulting from Prey-Driven Venom Variation. Toxins (Basel). 2018;10(10).
70. Sano-Martins IS, Santoro ML, Castro SCB, Fan HW, Cardoso JLC, Theakston RDG. Platelet aggregation in patients bitten by the brazilian snake *Bothrops*

jararaca. Thromb Res. 1997;87(2):183–95.

71. Sunitha K, Hemshekhar M, Thushara RM, Santhosh MS, Sundaram MS, Kemparaju K, et al. Inflammation and oxidative stress in viper bite: An insight within and beyond. Toxicon [Internet]. 2015;98(February):89–97. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.02.014

7. ANEXOS E APÊNDICES

7.1. Procedimentos operacionais padrão utilizados na tese

Abaixo seguem os procedimentos operacionais padrão (POPs) para a dosagem dos seguintes testes:

a) Tempo de coagulação do sangue total em 20 minutos (WBCT20);
b) Dosagem de fibrinogênio;
c) Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina (PDF);
d) Dosagem de D-dímero;
e) Dosagem de alfa 2-antiplasmina;
f) Dosagem de fator II (protrombina);
g) Dosagem de fator X;
h) Dosagem de fator V;
i) Dosagem de fator VII;
j) Dosagem de plasminogênio;
k) Dosagem de fator tissular (FT).

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Tempo de coagulação do sangue total em 20 minutos (WBCT20)		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever o método de determinação do tempo de coagulação do sangue total em 20 minutos.

2. DEFINIÇÕES

Não se aplica.

1. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de malária das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

2. RESPONSABILIDADES

- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

3. POP'S RELACIONADOS

Não se aplica.

4. PROCEDIMENTOS

a) Por punção venosa com seringa de plástico obter 1 mL de sangue do paciente;

b) Adicionar o volume de sangue em um tubo de vidro 13x100 mm de diâmetro, escorrendo pela parede do tubo;
c) Acionar o cronômetro, programando o tempo de 20 minutos;
d) Manter o tubo de vidro contendo o sangue em repouso e temperatura ambiente;
e) Após 20 minutos, inclinar o tubo de vidro suavemente a 90 º para observar a formação de coágulo de sangue.
f) Se após 20 minutos nenhum coágulo for observado, o sangue será considerado incoagulável. Se algum coágulo for observado, o sangue será coagulável

5. REFERÊNCIAS

- Sano-Martins IS, Fan HW, Castro SCB, Tomy SC, Franca FOS, Jorge MT, et al. Reliability of the simple 20 minute whole blood clotting test (WBCT20) as an indicator of low plasma fibrinogen concentration in patients envenomed by Bothrops snakes. Toxicon. 1994;32(9):1045–50.

- Warrell DA, Davidson NM, Greenwood BM, Ormerod LD, Pope HM, Watxins BJ, et al. Poisoning by bites of the saw-scaled orcarpetviper (Echis carinates) in Nigeria. Q Jl Med. 1977;46:33–62.

- Warrell DA, Looareesuwan S, Theakston RDG, Phillips RE, Chanthavanich P, Virivan C, et al. Randomized comparative trial of three monospecific antivenoms for bites by the Malayan pitviper (Calloselasma rhodostoma) in southern Thailand: clinical and laboratory correlations. Am J trop Med Hyg. 1986;35:1235–47.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de fibrinogênio		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da concentração de fibrinogênio baseado no método de Clauss em plasma humano citratado no sistema ACL TOP 300 (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha).

2. DEFINIÇÕES

Fibrinogênio: é uma glicoproteína com um peso molecular de 340000 dáltons composta de três pares de cadeias polipeptídicas chamadas de Aα, Bβ e γ. A trombina concerte o fibrinogênio em fibrina insolúvel.

Método de Clauss: Quando um excesso de trombina é adicionado ao plasma diluído para converter fibrinogênio em fibrina. O tempo de coagulação é inversamente proporcional à concentração de fibrinogênio plasmático. O tempo de coagulação obtido é comparado posteriormente com uma preparação de fibrinogênio padronizada.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe do laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas;
- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa de fibrinogênio deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha).

Vide bula abaixo:

7. REFERÊNCIAS

- Medved L,Weisel JW. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. J Thromb Haemost. 2009; 7(2): 355–359. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03242.x.

- Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haematol. 1957; 17: 237–246.

Fibrinogen-C - 0020301100

PORTUGUÊS - Revisão do folheto 07/2012 CE

Aplicação Prevista

Teste para a determinação quantitativa de Fibrinogénio baseado no método (Clauss) em plasma humano citratado nos Sistemas de Coagulação da IL.

Resumo e Princípio

Diversas deficiências congénitas do fibrinogénio resultam em conversão deficiente do fibrinogénio durante a coagulação.[1] O fibrinogénio é também um marcador útil na avaliação do estado de diversas doenças incluindo a Coagulação Intravascular Disseminada, as disfunções hepáticas, quadros inflamatórios e tumores malignos.[2] Níveis elevados de fibrinogénio estão associados a um aumento de risco de doenças cardiovasculares.[3,4,5] Níveis aumentados são também encontrados durante a gravidez e durante a utilização de contraceptivos orais, enquanto que durante uma terapêutica trombolítica, os referidos níveis diminuem.[2]
O kit de Fibrinogénio-C utiliza um excesso de trombina para converter o fibrinogénio em fibrina no plasma diluído. Em presença de concentração elevada de trombina e baixa concentração do fibrinogénio, a velocidade de reacção depende da concentração de fibrinogénio.[6]

Composição

O kit **Fibrinogen-C** é composto por:

T **Bovine thrombin** (Núm. Cat. 0020301110): recipientes 10 x 2 mL de trombina bovina liofilizada (35 UNIH/mL), que contém albumina bovina, cloreto de cálcio, tampão e estabilizantes.

AVISOS E PRECAUÇÕES:
Classe de risco: **nenhuma**
Frases de risco: **nenhuma**
Frases de segurança: **nenhuma**
Contém material de origem bovina. Todos os animais dadores eram oriundos de manadas isentas de BSE. Todo o gado foi inspeccionado ante e post-mortem por um veterinário e aparentemente não estavam infectados nem continham material contagioso. No entanto, o material deve ser tratado como potencialmente infeccioso.
Para uso em diagnóstico *in vitro*.

Preparação

Bovine thrombin: Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 2 mL de água destilada tipo CLR de acordo com a CLSI.[7] Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente reconstituído. Conservar o reagente entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar.

Conservação e estabilidade do reagente

Os reagentes fechados, que ainda não foram utilizados, são estáveis até ao final do prazo de validade, que consta no rótulo, desde que conservados entre 2-8°C.
Bovine thrombin - Estabilidade depois da reconstituição: 3 dias entre 2-8°C, um mês a -20°C dentro do recipiente original, 8 horas a 15°C nos Sistemas ACL ou 3 dias a 15°C nos Sistemas ACL Futura, ACL Advance e Família ACL TOP®.

Método de ensaio

Seguir as instruções da técnica de acordo com o Manual do Operador dos aparelhos IL ou com o Manual de Aplicações dos Aparelhos IL.

Recolha e preparação da amostra

Adicionar nove partes de sangue extraído recentemente por punção venosa a uma parte de citrato trissódico. Para efectuar a recolha, o manuseamento e a conservação da amostra devem seguir-se as recomendações referidas no documento H21-A5 da CLSI.[3]

Reagentes adicionais e plasmas de controlo

Este kit não inclui os produtos abaixo mencionados, pelo que deverão ser pedidos em separado:

	Américas e Pacífico Núm Cat.	Europa Núm Cat.
Plasma de Calibração	0020003700	0020003700
Controlo Normal	0020003120	0020003110
Controlo Anormal Baixo	0020003220	0020003210
Fibrinogénio Controlo Baixo	0020004200	0020004200
Diluente de factores	0009757600	0009757600
Solução de limpeza	0009831700	0009831700
Solução de limpeza	0009832700	0009832700

Controlo de Qualidade

Para realizar um programa completo de Controlo de Qualidade, recomenda-se a utilização dos controlos normais e anormais.[9,10]
Os controlos adequados para este programa são o Controlo Normal, o Controlo Anormal Baixo e o Fibrinogénio Controlo Baixo. Cada laboratório deve estabelecer a sua própria média e desvio padrão e deve efectuar um programa de controlo de qualidade para monitorizar os seus resultados.
Os controlos devem ser analisados, pelo menos uma vez em cada turno de 8 horas, de acordo com a norma vigente no Laboratório. Ver Manual do Operador para mais informações. Consultar a publicação de Westgard e col. para identificar e solucionar situações anormais do Controlo de Qualidade.[11]

Resultados

Os resultados do doente são expressos nas seguintes unidades:
- mg/dL ou g/L
- segundos

Para mais informações consultar o Manual do Operador dos Aparelhos.

Limitações/interferências

Não existe interferência nos resultados do Fibrinogénio-C por níveis de heparina até 1 U/mL, hemoglobina até 150 mg/dL, triglicéridos até 1022 mg/dL ou bilirrubina até 19,6 mg/dL.
Os resultados do Fibrinogen-C no ACL TOP não são afectados pela heparina até 1 U/mL, hemoglobina até 375 mg/dL, triglicéridos até 750 mg/dL, bilirubina até 21 mg/dL.
Os ensaios de Fibrinogénio-C podem ser afectados por produtos de degradação (fibrinogénio/fibrina) no plasma a analisar.[12]

Valores Esperados

Efectuou-se um estudo de intervalo normal de valores com o reagente Fibrinogénio-C.

Sistema	N	Intervalo (unidades)
Família ACL	35	220 - 496 (mg/dL)
ACL Futura/ACL Advance	35	203 - 472 (mg/dL)
Família ACL TOP	119	238 - 498 (mg/dL)

Estes resultados obtiveram-se com a utilização de um lote específico de reagente.
Devido a várias variáveis que podem afectar os tempos de coagulação, cada laboratório deve verificar os seus intervalos de valores normais.

Características de desempenho

Precisão:
A precisão foi avaliada, intra e na totalidade (de análise para análise e de dia para dia), ao longo de vários ensaios, com amostras normais e anormais.

Família ACL	Média (Fibrinogénio mg/dL)	CV% (Intra-análise)	CV% (Total)
Controlo Normal	334	1,31	3,69
Fibrinogénio Controlo Baixo	96	2,83	5,94
ACL Futura/ ACL Advance	**Média (Fibrinogénio mg/dL)**	**CV% (Intra-análise)**	**CV% (Total)**
Controlo Normal	329	2,75	4,93
Fibrinogénio Controlo Baixo	101	3,68	4,94
Família ACL TOP	**Média (Fibrinogénio mg/dL)**	**CV% (Intra-análise)**	**CV% (Total)**
Controlo Normal	303	4,5	5,5
Fibrinogénio Controlo Baixo	107	5,1	6,8

Correlação:

Sistema	declive	intersecção	r	Método de referência
ACL Futura/ACL Advance	0,94	-8,73	0,978	Fibrinogénio-C em ACL
Família ACL	0,88	22,90	0,983	Fibrinogénio Clauss
Família ACL TOP	0,98	-8,90	0,996	Fibrinogénio Clauss em ACL ELITE/ELITE PRO

Estes resultados de precisão e de correlação foram obtidos utilizando lotes específicos, de reagente e de controlo.

Linearidade:

Sistema	
Família ACL TOP	35 - 1000 mg/dL
ACL Futura/ACL Advance	80 - 700 mg/dL
Família ACL	70 - 700 mg/dL

Devido às variáveis que podem afectar os resultados, cada laboratório deve verificar o seu próprio intervalo de linearidade.

Bibliography / Literatur / Bibliografía / Bibliographie / Bibliografia /Bibliografia / Litteratur / Litteraturförteckning

1. Davis EW, Hougie C. and Lundblad RL. Mechanisms of blood coagulation, in: Recent Advances in Blood Coagulation, J & A Churchill Ltd, London 1969.
2. Grannis GF. Plasma fibrinogen: Determinations, normal values, physiopathologic shifts and fluctuations, Clin Chem. 1970; 6: 486-494.
3. Krobot K, *et al.* Determinants of plasma fibrinogen: Relation to body weight, waist-to-hip ratio, smoking, alcohol, age and sex, Arteriosclerosis and Thrombosis. 1992; 12(7): 780-788.
4. Stone MC, and Thorp JM. Plasma fibrinogen: A major coronary risk factor, J R Coll Gen Pract. 1985; 35: 565-569.
5. Kannel WB, *et al.* Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study, JAMA. 1987; 258(9): 1183-1186.
6. Clauss A. Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens, Acta Haemat. 1957;17: 237.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Fourth, Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No.22.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Haemostasis Assays; Approved Guideline – Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; Approved Guideline, CLSI Document H-30A; Vol. 14 No. 2.
10. Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.
11. Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.
12. Bovill EG, and Tracy RP. Methods for the Determination of the Plasma concentration of Fibrinogen, Williams Hematology, Fifth Edition; L36: L87-L89.

The Instrumentation Laboratory logo, HemosIL, ACL, ACL Futura, ACL ELITE and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory Company and/or one of its subsidiaries or parent companies, and may be registered in the United States Patent and Trademark Office and in other jurisdictions.
©2008 Instrumentation Laboratory
U.S. Patents 4,401,652 and 4,485,174

Issued July 2012
Printed in U.S.A.

Instrumentation Laboratory
Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 (USA)
Instrumentation Laboratory SpA - V.le Monza 338 - 20128 Milano (Italy) EC REP

303646 R4 07/2012

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina (PDF)		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a detecção e determinação semi-quantitativa dos PDF em plasma humano citratado por aglutinação de partículas de látex, sensibilizadas por meio de um anticorpo monoclonal.

2. DEFINIÇÕES

Fibrinogênio: é uma glicoproteína com um peso molecular de 340000 dáltons composta de três pares de cadeias polipeptídicas chamadas de Aα, Bβ e γ.

Fibrinólise: A trombina concerte o fibrinogênio em fibrina insolúvel. A fibrinólise pode ser definida como a degradação da fibrina, mediada pela plasmina, uma enzima ativa. A plasmina também é capaz de degradar o fibrinogênio. O resultado é a geração de produtos de degradação de fibrinogênio/fibrina.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de malária do IPCCB de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A detecção e determinação semi-quantitativa do PDF em plasma citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França). Vide bula em anexo.

7. REFERÊNCIAS

- Medved L,Weisel JW. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. J Thromb Haemost. 2009; 7(2): 355–359. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03242.x.

- Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina. 2001; 34:229-237.

8. ANEXOS

FDP PLASMA

Detecção e determinação semi-quantitativa dos PDF no plasma por aglutinação de partículas de látex

- Kit de cerca de 60 testes contendo:
  - 1 frasco de Reagente 1 (Latex)
  - 1 frasco de Reagente 2 (Buffer)
  - 1 frasco de Reagente 3 (Control ⊖)
  - 1 frasco de Reagente 4 (Control ⊕)
  - 10 placas
  - agitadores

(REF 00540) IVD CE

Janeiro 2015 Português 8

1/ FINALIDADE

Detecção e determinação semi-quantitativa dos produtos de degradação do fibrinogénio/fibrina (PDF) no plasma por aglutinação de partículas de látex, sensibilizadas por meio de um anticorpo monoclonal.

2/ AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E INTERESSE CLÍNICO

- O fibrinogénio é uma glicoproteína com um peso molecular de 340 000 daltons, constituída por duas zonas periféricas D e um domínio central E (2).
  In vivo, a trombina transforma o fibrinogénio plasmático em fibrina insolúvel. O coágulo de fibrina é estabilizado pelo factor XIII. A plasmina degrada o fibrinogénio, mas também a fibrina, provocando o aparecimento de produtos de degradação (2). Os produtos X e Y constituem os produtos precoces da degradação do fibrinogénio e da fibrina não estabilizada, os fragmentos D e E, os produtos tardios (2). A degradação, por meio da plasmina, da fibrina estabilizada provoca a formação de complexos denominados X-oligómeros (YXD/DXY, YY/DXD, DY/YD) e depois o fragmento final, o D-dímero (2).
- Normalmente, a actividade fibrinolítica mantém-se localizada nas proximidades do coágulo de fibrina porque a α_2-antiplasmina e os inibidores do activador de plasminogénio impedem a disseminação da fibrinólise.
  Em contrapartida, na coagulação intravascular disseminada (CIVD) a fibrinólise transborda e generaliza-se, e a degradação do fibrinogénio circulante torna-se possível (2). Os produtos formados são então muito heterogéneos: produtos derivados da fibrina, complexos solúveis, produtos de degradação do fibrinogénio e da fibrina não estabilizada.
  Uma actividade fibrinolítica e/ou fibrinogenolítica anormal, demonstrada através de uma taxa de PDF plasmáticos elevada, pode ser igualmente observada nas circunstâncias clínicas seguintes (3, 5, 6):
  - eclâmpsia
  - tumores malignos (leucemia promielocitária,...)
  - complicações pós-operatórias
  - doença cardíaca ou hepática
  - fibrinólise
  - embolia pulmonar
  - tromboses venosas.

  Como a eliminação dos PDF é rápida (4), uma taxa constantemente elevada ou a *fortiori* um aumento, é indicadora da persistência do agente causal.

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

Em presença dos antigénios correspondentes, as partículas de látex sensibilizadas por anticorpos anti-PDF formam aglutinados macroscópicos. O kit **FDP Plasma** permite assim pôr em evidência os PDF e avaliá-los de forma semi-quantitativa.

4/ COMPOSIÇÃO

- **Reagente 1**: frasco de 1,3 ml de suspensão de partículas de látex sensibilizadas por anticorpos monoclonais de ratinho anti-PDF humanos.
- **Reagente 2**: frasco de 20 ml de tampão glicina.
- **Reagente 3**: frasco de 0,5 ml de solução isenta de PDF.
- **Reagente 4**: frasco de 0,5 ml de solução contendo PDF de origem humana.
- **Placas** descartáveis.
- **Agitadores** descartáveis.

Os Reagente contêm azida sódica (< 1 g/l) como conservante.
Os reagentes contendo azida sódica devem ser eliminados com precaução. Se estas soluções se destinarem a ser eliminadas na canalização, é necessário misturá-las com água corrente em abundância, a fim de evitar a formação de azidas metálicas que, quando em grande concentração, podem provocar explosões.

Alguns dos reagentes deste kit contêm produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que se utilizou plasma humano na preparação destes reagentes, procedeu-se à detecção do antigénio HBs, dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, a qual foi comprovada como negativa. No entanto, nenhum teste pode garantir, de forma absoluta, a ausência de qualquer agente infeccioso. Assim, estes reagentes de origem biológica devem ser manipulados com as precauções habitualmente empregues quando se trata de produtos potencialmente infecciosos.

5/ PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico *in vitro*. Estes reagentes só podem ser utilizados por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.
Manipular com as precauções de manuseamento os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação dos resíduos deverá processar-se em cumprimento com a regulamentação local em vigor.

6/ RECOLHA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.

- Colheita de sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue.
- Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g.
- Conservação do plasma: 8 horas a 20 ± 5 °C
  1 mês a –20 °C. Colocar a amostra a 37 °C o tempo necessário e suficiente para a descongelação tota.

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS REAGENTES

Quando conservados a 2-8 °C na embalagem de origem, os reagentes mantêm-se estáveis até ao prazo de validade indicado na embalagem.
Deixar os reagentes estabilizar durante 30 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C) antes de utilizar.
Agitar o frasco de Reagente 1 antes de cada utilização, para homogeneizar o meio.
Estabilidade após a abertura: quando conservados entre 2-8 °C, na embalagem original devidamente fechada, os Reagentes 1, 2, 3 e 4 mantêm-se estáveis até ao prazo de validade indicado na embalagem, na ausência de qualquer contaminação.

8/ MATERIAL AUXILIAR

Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

Assegurar-se de que todos os reagentes se encontram à temperatura do laboratório.
Os plasmas a testar são diluídos em tubo de plástico a 1/2 (50 µl de plasma + 50 µl de Reagente 2) e a 1/8 (50 µl de plasma + 350 µl de Reagente 2) em Reagente 2.

Em seguida, depositar nos anéis da placa, 20 µl de cada uma destes diluições e, nos anéis vizinhos, 20 µl dos Reagentes 3 e 4. Em cada um destes 4 anéis, adicionar 20 µl de Reagente 1 (previamente homogeneizado). Misturar por meio de agitadores diferentes o conteúdo de cada anel. Agitar levemente a placa por rotação durante 3 minutos.

Observar o eventual aparecimento de uma aglutinação nas análises do doente e comparar com os controlos negativo e positivo.

10/ RESULTADOS

Como o limiar de detecção do método é de 2,5 µg/ml, uma aglutinação num anel indica a presença de PDF a uma concentração superior ou igual a 2,5 µg/ml para a diluição correspondente.

Diluição 1/2	Diluição 1/8	Taxa de PDF (µg/ml)
–	–	< 5
+	–	5 ≤ < 20
+	+	≥ 20

–: ausência de aglutinação +: presença de aglutinação

Verificar se os resultados obtidos para os Reagentes 3 e 4 são bem negativos e positivos, respectivamente. Se não se obtiverem estes resultados, verificar o funcionamento correcto do sistema: condições operatórias, reagentes, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir os testes.

11/ DETERMINAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA

A taxa de PDF pode ser medida com maior precisão quanto maior for o número de diluições realizadas. Efectuar, por exemplo, diluições de ritmo 2 a partir da amostra de plasma. A taxa de PDF da amostra é, pelo menos igual ao valor do limiar de detecção, multiplicado pelo inverso do factor de diluição (d) da mais elevada diluição que permita obter aglutinação:

$$\text{taxa de PDF (µg/ml)} \geq 2{,}5 \times d.$$

FMT-HVD FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

12/ LIMITES DO MÉTODO

- Um início de coagulação da amostra, mesmo que mínino é susceptível de induzir uma falsa aglutinação.
- A presença de uma taxa elevada de factor reumatóide (FR) pode provocar uma aglutinação. Em caso de uma taxa de PDF inexplicável, poderá revelar-se útil proceder-se a detecção do FR.
- Foi demonstrado que as heparinas (HNF e HBPM) não interferem com esta quantificação até às concentrações de 2 UI/ml.
- A presença de anticorpos anti-ratinho em determinados indivíduos pode conduzir a resultados erróneos.

13/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

A taxa de PDF no plasma é normalmente inferior a 5 µg/ml (1). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

14/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

- **Especificidade**
  As partículas de látex são sensibilizadas por um anticorpo monoclonal que reagent com os produtos de degradação da fibrina e os produtos de degradação do fibrinogénio. Pelo contrário, este anticorpo não reconhece o fibrinogénio nativo (1).
- **Efeito "Dose-Hook"**
  Não se observou qualquer efeito "Dose-Hook" até concentrações em PDF (fibrina e fibrinogénio) de 500 µg/ml.
- **Reprodutibilidade**
  Estudos de reprodutibilidade intra-série (n = 21) e inter-séries (n = 10) foram realizados numa amostra normal e numa amostra positiva. Não se observou, em nenhum dos casos, qualquer aglutinação com a amostra normal, enquanto que, com a amostra positiva, observou-se a presença de uma aglutinação.

BIBLIOGRAFIA

1. MIRSHAHI M., SORIA J., SORIA C., PERROT J.Y., BOUCHEIX C.: "A latex immunoassay of fibrin/fibrinogen degradation products in plasma using a monoclonal antibody". Thromb. Res., **44**, 715-728, 1986.
2. NIEUWENHUIZEN W.: "New strategies in the determination of fibrin and fibrin(ogen) derivatives by monoclonal antibodies". Blut, **57**, 285-291, 1988.
3. WILDE J.T., KITCHEN S., KINSEY S., GREAVES M., PRESTON F.E.: "Plasma D-dimer levels and their relationship to serum fibrinogen/fibrin degradation products in hypercoagulable states". Br. J. Haematol., **71**, 65-70, 1989.
4. LAMBERT H., LARCAN A.: "Les coagulations intravasculaires disséminées". Thromboses, 113-146, 1990.
5. TAKAHASHI H., TATEWAKI W., WADA K., NIWANO H., SHIBATA A.: "Fibrinolysis and fibrinogenolysis in disseminated intravascular coagulation". Thromb. Haemostasis, **63**, 3, 340-344, 1990.
6. NIEUWENHUIZEN W., BOS R.: "Soluble fibrin and degradation products of fibrinogen (FgDP), fibrin (FbDP; D-dimer) and total of FgDP and FbDP (TDP)". Laboratory techniques in thrombosis - ECAT assay procedures. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 275-284, 1999.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
webmaster@stago.com

Stago

As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos de propriedade intelectual, © 2015, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logotipos e/ou os nomes dos produtos de Diagnostica Stago são marcas registadas. Português

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de D-dímero		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa do D-dímero em plasma humano citratado, utilizando um imunoensaio de látex, no sistema ACL TOP 300 (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha).

2. DEFINIÇÕES

D-dímero: O D-dímero é um derivado formado após a degradação da fibrina, com ligações cruzadas pelo fator XIIIa, pela plasmina

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe do laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas;
- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa do D-dímero em plasma humano citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha). Vide bula em anexo.

7. REFERÊNCIAS

- Medved L,Weisel JW. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. J Thromb Haemost. 2009; 7(2): 355–359. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03242.x.

8. ANEXOS

D-Dimer HS 500 - 0020500100

PORTUGUÊS - Revisão do folheto 03/2015

CE

Utilização prevista

O HemosIL D-Dimer HS 500 é um imunoensaio de latex melhorado e automatizado para a determinação quantitativa do D-Dímero no plasma humano citratado nos sistemas da família ACL TOP® para utilização em conjunto com um modelo de avaliação da probabilidade clínica pré-teste (PTP) para exclusão do tromboembolismo venoso (TEV) em doentes de ambulatório com suspeita de trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TEP).

Resumo e princípio

O D-Dímero está contido nos derivados solúveis formados após degradação pela plasmina, da fibrina com ligações cruzadas do Factor XIIIa (XDP).[1] A plasmina, uma serina protease, quando está sem inibidores digere a fibrina cruzada insolúvel, resultando em vários derivados solúveis. Os seus pesos moleculares dependem da extensão da digestão. Estes produtos de degradação da fibrina solúveis contêm um neo-antigénio (domínio D-Dímero) que não está presente na molécula original de fibrinogénio, nos seus produtos de degradação ou na fibrina solúvel.[2,3] A determinação do D-Dímero está a tornar-se uma ferramenta generalizada para o diagnóstico da trombose e monitorização da terapêutica tromboembolítica.[4]

São encontrados níveis elevados de D-Dímero em situações clínicas como trombose venosa profunda (TVP), tromboembolismo pulmonar (TEP) e coagulação intravascular disseminada (CID).[5] Os níveis de D-Dímero também aumentam na gravidez normal, mas os níveis muito elevados estão associados a complicações.[6]

Demonstrou-se que um resultado negativo de D-Dímero, quando combinado com uma avaliação clínica de baixa probabilidade pré-teste tem um valor preditivo negativo elevado para TVP ou TEP.[7-13]

O reagente Latex é uma suspensão de partículas de latex poliestireno de tamanho uniforme, revestidas com o fragmento $F(ab')_2$ de um anticorpo monoclonal altamente específico para o domínio D-Dímero incluído nos derivados solúveis da fibrina. A utilização do fragmento $F(ab')_2$ permite uma detecção do D-Dímero mais específica, evitando a interferência de alguns factores endógenos como o Factor Reumatóide. Quando um plasma com D-Dímero é misturado com o reagente Latex e com o Reaction Buffer no kit HemosIL D-Dimer HS 500, as partículas de látex revestidas, aglutinam-se. O grau de aglutinação é directamente proporcional à concentração do D-Dímero na amostra e é determinada pela medição do decréscimo da transmissão de luz causada pelos agregados (imunoensaio turbidimétrico).[14]

Composição

O kit **D-Dimer HS 500** consiste em:

R **Latex Reagent** (Cat. No. 0020500110): 3 frascos x 4 mL de suspensão de partículas de látex poliestireno revestidas com o fragmento $F(ab')_2$ do anticorpo monoclonal de ratinho (MA-8D3) dirigido contra o D-Dímero com albumina sérica bovina, tampão, estabilizantes e conservante.

B **Reaction Buffer** (Cat. No. 0020500120): 3 frascos x 6 mL de tampão Hepes com albumina sérica bovina, estabilizantes e conservante.

C **D-Dimer Calibrator** (Cat. No. 0020500130): 2 frascos x 1 mL de uma solução liofilizada de D-Dímero parcialmente purificada a partir de fibrina humana digerida com plasmina humana com albumina sérica bovina, tampão, estabilizantes e conservante.

PRECAUÇÕES E AVISOS:

Os materiais deste produto foram analisados por métodos aprovados pela FDA e dados como não reactivos para o antigénio de superfície da Hepatite B (HbsAg), Anti-HCV e anticorpos HIV 1/2. Manipule como potencialmente infeccioso.[15]

O Reaction Buffer contém menos de 0,1% de azida sódica, que pode formar azidas explosivas na canalização metálica. Utilize os procedimentos adequados de eliminação.

Classe de perigo: **nenhuma**
Advertências de perigo: **nenhuma**
Recomendações de prud ncia: **nenhuma**

Este produto destina-se a utilização em diagnóstico *in vitro*.

Preparação

Latex Reagent: Antes de utilizar, rode suavemente várias vezes. Não agite com força. Evite formar espuma.

Reaction Buffer: Misture suavemente várias vezes, antes de utilizar. Não agite com força. Evite formar espuma.

D-Dimer Calibrator: Dissolva o conteúdo de cada frasco com 1 mL de água CLSI (anteriormente NCCLS) tipo CLRW ou equivalente.[16] volte a colocar a tampa e rode suavemente. Assegure-se de que o produto está completamente reconstituído. Mantenha o reagente entre 15-25°C durante 30 minutos e inverta suavemente antes de utilizar. Não agite com força. Evite formar espuma.

Nota: As bolhas de ar no cimo dos líquidos podem interferir com os sensores de líquidos dos instrumentos.

Conservação e estabilidade dos reagentes

Os reagentes e calibrador selados são estáveis até ao fim do prazo de validade, impresso no frasco, desde que conservado entre 2-8°C.

Latex Reagent - O reagente aberto é estável durante 1 mês a 2-8°C no frasco original ou durante 7 dias a 15°C nos ACL TOP Family.

Reaction Buffer - O reagente aberto é estável durante 1 mês a 2-8°C no frasco original ou durante 7 dias a 15°C nos ACL TOP Family.

POR FAVOR NOTE QUE: O reagente D-Dimer HS 500 Latex e Reaction Buffer têm as mesmas reivindicações de estabilidade e devem ser ambos utilizados nos sistemas IL Coagulation. Se um frasco for substituído, o outro componente (por ex. Latex Reagent ou Reaction Buffer) também deverá ser substituído simultaneamente, independentemente do seu conteúdo remanescente.

D-Dimer Calibrator - Estabilidade pós-reconstituição: 1 mês a 2-8°C, 3 dias a 15-25°C, ou 2 meses a -20°C no frasco original. O Calibrador congelado pode ser descongelado a 37°C e misturado suavemente, antes de utilizar. Não torne a congelar.

Para uma estabilidade óptima, remova os reagentes do sistema e conserve-os entre 2-8°C no frasco original.

⚠ A humidade relativa baixa está associada ao aumento da evaporação de reagentes não tapados, o que pode diminuir a estabilidade no instrumento. Para obter uma estabilidade óptima no instrumento, a temperatura do laboratório e a humidade devem ser controladas.

Instrumento/procedimentos de teste

Consulte o manual do operador/manual de aplicação para obter as instruções de procedimento completas.

Colheita e preparação das amostras

Nove partes de sangue venoso fresco colhidos numa parte de citrato de sódio. Consulte o CLSI Document H21-A5 para obter mais instruções sobre colheita de amostras, manipulação e conservação.[17]

Descongele as amostras congeladas rapidamente a 37°C e centrifugue o plasma antes de analisar. Depois de descongelar, o ensaio deve ser realizado no espaço de 2 horas.

Reagentes adicionais e plasmas controlo

Os seguintes não são fornecidos com o kit e devem ser adquiridos separadamente.

D-Dimer HS 500 Controls	Cat. No. 0020500200
Factor diluent	Cat. No. 0009757600

Controlo de qualidade

São recomendados 2 níveis de controlo para um programa completo de controlo de qualidade.[18] Os D-Dimer HS 500 Controls Low e High são desenhados para este programa. Cada laboratório deve estabelecer a sua própria média e desvio padrão e deve estabelecer um programa de controlo de qualidade para monitorização dos testes de laboratório. Os controlos devem ser analisados, pelo menos uma vez, em cada turno de 8 horas, de acordo com as boas práticas de laboratório. Consulte o manual do operador do instrumento para obter informações adicionais. Consulte o manual do operador do instrumento para obter informação adicional. Consulte Westgard et al para identificação e resolução de situações fora do controlo.[19]

Rastreabilidade dos calibradores e materiais de controlo

Os valores notificados foram determinados ao longo de múltiplas análises no sistemas da família ACL TOP utilizando lotes específicos de reagentes e contra um padrão interno.

Como actualmente não existe um padrão internacional de D-Dímero, foi atribuído um padrão interno de acordo com os critérios de harmonização propostos por W. Niewenhuizen[20-22] e P. Meijer [23].

Resultados

Os resultados do D-Dimer HS 500 são notificados em ng/dL. Estas unidades correspondem a ng/ml de Unidades Equivalentes de Fibrinogénio (FEU).Consulte o manual do operador do instrumento para obter informação adicional.

Limitações/substâncias interferentes

Os resultados de D-Dímero no ACL TOP Family não são afectados pela hemoglobina até 500 mg/dL, bilirrubina até 18 mg/dL, triglicerídos até 1327 mg/dL e Factor Reumatóide até 1400 IU/mL.

O anticorpo monoclonal MA-8D3) utilizado no Latex Reagent tem uma grande especificidade para o domínio D-Dímero dos produtos de degradação da fibrina com ligações cruzadas.

Foi observada uma reactividade cruzada baixa com os produtos de degradaçaõ do Fibrinogenio, em amostras plasmaticas baptizadas com Fragmentos D e E purificados, acima de 10 µg/mL. As amostras de doentes que receberam preparações de anticorpos monoclonais de ratinho para diagnóstico ou terapêutica, podem conter anticorpos humanos anti-ratinho purificados (HAMA). A presença de HAMA podem causar um sobre-estimação dos resultados dos imunoensaios que utilizam estes anticorpos. O Reaction Buffer contém um agente bloqueante contra os HAMA para minimizar esta interferência nos resultados do ensaio.

Valores esperados

Foi efectuado um estudo de intervalo normal, com 138 amostras de plasma provenientes de um banco de sangue.

Sistema	N	Intervalo Normal Superior (unidades)
ACL TOP Family	138	500 ng/mL

Devido a muitas variáveis que podem afectar os resultados (incluindo a idade da população),[24-25] cada laboratório deve estabelecer o seu próprio intervalo normal. Os resultados do ensaio devem ser utilizados com outra informação, incluindo o contexto clínico, para formar um diagnóstico.

Características de desempenho

Precisão:

Foi avaliada a precisão intra-análise (análise-a-análise) e total (dia-a-dia) ao longo de análises múltiplas.

ACL TOP Family	Média (ng/mL)	CV% (intra-análise)	CV% (Total)
D-Dimer Plasma Pool	423	7,2	9,5
Low D-Dimer HS 500 Control	877	2,9	8,9
High D-Dimer HS 500 Control	2469	2,5	7,3

Correlação:[21]

Sistema	N	Declive	Intersecção	r	método de referência
ACL TOP Family	100	1,00	-147	0,981	Método ELISA (ng/mL)

Foi realizado um estudo de resultados em 295 amostras congeladas de doentes admitidos consecutivamente numa urgência hospitalar, com suspeita de TEP ou TVP (frequência de doença trombótica venosa 25,4%). Das 295 amostras, 75 foram confirmadas como TEV positiva (47 TEP e 28 TVP) por testes padrão objectivos e as restantes 220 foram confirmadas como negativas.

Os resultados resumidos a seguir, baseiam-se num cut-off de 500 ng/mL (FEU):

Sistema	N	Sensibilidade (95% CI)	Especificidade (95% CI)	Valor preditivo negativo (95% CI)
ACL TOP Family	295	100% (95,2% - 100%)	42,3% (35,7% - 49,1%)	100% (96,1% - 100%)

O desempenho clínico foi estudado avaliando amostras de doentes com suspeita de TVP e EP com o HemosIL D-Dimer HS 500, juntamente com a pontuação do pré-teste de probabilidade do doente (PTP) para excluir trombombolismo venoso (VTE):

Um estudo de gestão multi-cêntrico foi realizado em quatro hospitais com 747 amostras de doentes admitidos consecutivamente nas urgências com suspeita de TVP ou EP. Quatrocentros e um doentes tinham suspeita TVP e 346 doentes tinham suspeita de EP. Como parte do estudo, Os doentes realizaram um com o modelo Wells e foram classificados como tendo uma probabilidade elevada, moderado ou baixa de TVP ou EP. Os doentes com um teste resultado de D-dímero negativo e uma baixa pontuação PTP não realizaram mais testes de diagnóstico e foram seguidos 3 meses depois, para averiguar desenvolvimento de TVP ou EP. Para doentes com um resultado de D-dímero negativo

e PTP moderado, foi decisão do médico realizar o follow-up após 3 meses ou realizar técnicas imagiológicas. Os doentes com um resultado de D-dímero positivo ou uma pontuação PTP elevada realizaram técnicas imagiológicas.

A prevalência total de TVP na população total de amostras foi de 22.4% (90/401). A prevalência total de TEP na população total de amostras foi de 15.0% (52/346). No seguimento de 3 meses, nenhum dos doentes com um teste de D-Dímero negativo, desenvolveu TVP ou TEP.

A sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo (NPV) do HemosIL D-Dimer HS 500 para TVP e TEP utilizando o cut-off clínico de 500 ng/mL previamente estabelecido, é resumido a seguir com os correspondentes intervalos de confiança a 95% (IC):

Desempenho TVP	Todas amostras	PTP elevado	PTP Baixo+ Moderado
n	401	79	322
Sensibilidade	100,0% (90/90) (96,0%-100,0%)	100,0% (45/45) (92,1%-100.0%)	100,0% (45/45) (92,1%-100,0%)
Especificidade	42,1% (131/311) (36,6%-47,8%)	32,4% (11/34) (17,4%-50,5%)	43,3% (120/277) (37,4%-49,4%)
Valor preditivo Negativo	100,0% (131/131) (97,2%-100,0%)	100.0% (11/11) (71,5%-100,0%)	100.0% (120/120) (97,0%-100,0%)

Desempenho TEP	Todas amostras	PTP elevado	PTP Baixo+Moderado
n	346	24	322
Sensibilidade	100.0% (52/52) (93,2% - 100,0%)	100,0% (9/9) (66,4% - 100,0%)	100,0% (43/43) (91,8% - 100,0%)
Especificidade	48,3% (142/294) (42,5% - 54,2%)	33,3% (5/15) (11,8%-61,6%)	49,1% (137/279) (43,1%- 55,1%)
Valor preditivo Negativo	100,0% (142/142) (97,4% - 100,0%)	100,0% (5/5) (47,8% -100,0%)	100,0% (137/137) (97,3%- 100,0%)

Os resultados de precisão e de correlação foram obtidos utilizando lotes específicos de reagentes e de controlos

Limite de detecção:

Sistema	
ACL TOP Family	203 ng/mL

Linearidade:

Sistema	Auto Rerun desligado	Auto Rerun ligado
ACL TOP Family	215 - 7650 ng/mL	215 - 128000 ng/mL

Quando a capacidade de auto-análise do instrumento está activada, este realiza uma diluição on-board e corrige o resultado final para o factor de diluição, expandindo portanto o intervalo do teste até 128000 ng/mL. Se o resultado continuar a exceder o intervalo alargado, ou seja, as amostras estão acima dos 128000 ng/mL, então a amostra deve ser diluída manualmente de 1:100 com Factor Diluent (20 µL de amostra + 1980 µL de Factor diluent) e re-analisada com o ensaio padrão. O resultado tem de ser multiplicado por 100 para corrigir a diluição.

O ensaio não apresenta efeito prozona até 320000 ng/mL.

Instrumentation Laboratory
A Werfen Company
Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 (USA)
Instrumentation Laboratory SpA - V.le Monza 338 - 20128 Milano (Italy) EC REP

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de alfa 2-antiplasmina		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da concentração de alfa 2- antiplasmina em plasma humano citratado pelo método do substrato cromogênico sintético.

2. DEFINIÇÕES

Alfa 2-antiplasmina: é uma glicoproteína de peso molecular aproximadamente 65000 dáltons, que atua diretamente sobre a plasmina inibindo-a.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de malária do IPCCB de amostras relacionadas à pesquisa;

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB;

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa da concentração de alfa 2- antiplasmina em plasma humano citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França), utilizando os protocolos alternativos. Vide bula em anexo.

7. REFERÊNCIAS

- Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina. 2001; 34:229-237.

8. ANEXOS

STA® - STACHROM® ANTIPLASMIN

Colorimetric Assay of Antiplasmin by STA® Analyzers

- Kit Containing:
  - 4 x 2-ml Vials of Reagent 1 (Plasmin)
  - 4 x 6-ml Vials of Reagent 2 (Substrate)
  - 4 x 2-ml Vials of Reagent 3 (Plasmin Solvent)

(Cat. No. 00659)

23460 - Revised April 1997/2

1/ INTENDED USE

The **STA® - Stachrom® Antiplasmin** kit is intended for use with STA® analyzers (STA® and STA Compact®) for the quantitative determination of the antiplasmin level by the synthetic chromogenic substrate method. (In the USA, this procedure has been assigned to the high complexity category per CLIA 1988 - CDC Analyte Code 0463; CDC Test System Code 04677).

2/ SUMMARY AND EXPLANATION

α_2-Antiplasmin is a single-chain glycoprotein of molecular weight approximately 65,000 daltons. It reacts with the light chain of the plasmin molecule to form a complex in stoichiometric proportions. Its rapid action with plasmin suggests that it is the main regulator of fibrinolysis.

α_2-Antiplasmin is synthesized in the liver. Its level is depressed during liver diseases (11). The measurement of the antiplasmin level is useful:

- in the detection of the rare congenital deficiencies (Miyasato's disease) (4, 10, 12)
- in monitoring the efficacy of fibrinolytic treatments (3) since a decrease of the α_2-antiplasmin level is evidence that the treatments are responsive (7, 9)
- as an adjunct test in the diagnosis of compensated or decompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) (8).

3/ TEST PRINCIPLE

In the presence of added plasmin (Reagent 1), the test plasma exhibits a rapid and powerful potential for inhibiting plasmin, and this inhibition is exerted by the antiplasmin present in the test plasma. The STA® - Stachrom® Antiplasmin assay is carried out in two steps:

- incubation of the test plasma with a known excess of plasmin

$$\underset{\text{(excess)}}{\text{antiplasmin + plasmin}} \longrightarrow \underset{\text{(residual)}}{\text{plasmin-antiplasmin + plasmin}}$$

- determination of the residual plasmin by its amidolytic activity on the synthetic chromogenic substrate CBS 10.85 (Reagent 2) (pNA release at 405 nm)

$$\text{plasmin (residual) + CBS 10.85} \longrightarrow \text{pNA}$$

The residual quantity of plasmin (as measured by the pNA release) is inversely proportional to the antiplasmin level of the test sample.

4/ KIT REAGENTS

A bar-code insert is provided in the box. This bar-code contains the following information: lot number, kit code number, reagent code numbers, expiration date.

- **Reagent 1**: human plasmin, freeze-dried. The plasmin activity per vial is approximately 26 nKat.
- **Reagent 2**: chromogenic substrate CBS 10.85, approx. 12 µmoles per vial of MM-L-Tyr-Arg-pNA, AcOH, freeze-dried.
- **Reagent 3**: 2-ml vial of solvent containing glycerin. This solvent is intended for the reconstitution of Reagent 1 (Plasmin).

This reagent contains sodium azide as a preservative.
Reagents containing sodium azide should be discarded with care to prevent the formation of explosive metallic azides. When dumping waste materials into sinks, use copious quantities of water to flush plumbing thoroughly.

WARNING-POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL
The Reagent 1 is of human origin.
Each donor unit used in the preparation of this material was tested by an FDA-approved method for the presence of the antibody to HIV, antibody to hepatitis C virus and hepatitis B surface antigen, and found to be negative. Since no test method can offer complete assurance that HIV, hepatitis B virus, hepatitis C virus, or other infectious agents are absent, this material should be handled at the Biosafety Level 2 as recommended for any potentially infectious human serum or blood specimen in the Centers for Disease Control/National Institutes of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.

5/ CAUTION

For *in vitro* diagnostic use only. Store at 2-8 °C.
The STA® - Stachrom® Antiplasmin kit is designed for use with STA® analyzers. Read carefully the Operator's Manual of the analyzer model before use of these reagents. Exercise great care in handling reagents and patient samples; refer to chapter "1.8. Warnings" of the Operator's Manual. In the USA, wherever appropriate, observe CLIA-88 requirements.

6/ SPECIMEN COLLECTION AND TREATMENT

- Blood (9 vol.) is collected in 0.109 M (i.e., 3.2 %) trisodium citrate anticoagulant (1 vol.) (in the USA follow NCCLS guidelines H3-A3 and H21-A2).
- Centrifugation: 15 minutes at 2,500 g.
- Plasma storage: 8 hours at 20 °C
  2 days at 2-8 °C
  1 month at –20 °C.

7/ REAGENT PREPARATION AND STORAGE

The reagents in intact vials are stable until the expiration date indicated on the box label, when stored at 2-8 °C.

- **Reagent 1**
  Take one vial of Reagent 3 and shake it well. Then, pour its entire contents into a vial of Reagent 1 of the same kit. Allow the reconstituted reagent to stand at room temperature (18-25 °C) for 60 minutes. Swirl vial gently; then, place an STA® - mini Reducer* (Cat. No. 00797) and the perforated cap on the vial.
  Reconstituted stability in original vial with STA® - mini Reducer and perforated cap in place: 8 days on STA® analyzers (15-19 °C).
- **Reagent 2**
  Reconstitute each vial with 6 ml of distilled water. Allow the reconstituted reagent to stand at room temperature (18-25 °C) for 60 minutes. Swirl vial gently; then, place an STA® - mini Reducer* (Cat. No. 00797) and the perforated cap on the vial.
  Reconstituted stability in original vial with STA® - mini Reducer and perforated cap in place: 8 days on STA® analyzers (15-19 °C).
  Do not freeze.
- **Reagent 3** is ready for use. Shake vial well before use to reconstitute Reagent 1.

* Each STA® - Reducer is used only once. Do not re-use it.

8/ REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- **STA® - Owren-Koller** (Cat. No. 00360).
- For calibration: **STA® - Unicalibrator** (Cat. No. 00675).
- For quality control: **STA® - System Control** [N] + [P] (Cat. No. 00678), normal and abnormal levels.
- Sterile deionized or distilled water.
- Analyzer of the STA® line.
- STA® - mini Reducer (Cat. No. 00797).

9/ PROCEDURE

Refer to the appropriate chapters of the Operator's Manual, particularly those for calibration, loading and quality control.

9.1. Calibration

Assay calibration is performed with STA® - Unicalibrator. Prepare the STA® - Unicalibrator and transfer to the instrument the information contained in the bar-code of the Assay Value insert as instructed in the insert of this product. The standards are automatically prepared by the STA® by dilution with Owren-Koller buffer according to the parameters entered in the STA® for the assay. The Owren-Koller buffer alone represents the 0 %-point.
The calibration curve can be examined on the STA® screen in the "Calibration" menu (see Operator's Manual).

9.2. Patients' Plasmas

Patients' plasmas are used undiluted. Dilutions with Owren-Koller buffer are automatically prepared by the STA®.
Patients' plasmas are identified by the STA® either by scanning their bar-codes across the STA® bar-code reader, or by manually entering their identifications on the keyboard. Then, they are placed in the sample drawer. The beep emitted by the instrument indicates to the operator that identification and position of the sample are validated by the STA®.
Then, select the test(s) to be performed.

9.3. Quality Control

It is necessary to run controls in order to ensure accuracy and reproducibility of the results.
Two different levels of control should be included in each work-shift. Use STA® - System Control [N] + [P]. Prepare the controls and transfer to the STA® the information contained in the bar-codes printed in their respective bar-code inserts as instructed by the package insert of the box. These controls are used undiluted; the dilution with Owren-Koller buffer is automatically prepared by the STA®.

DIAGNOSTICA STAGO
9, rue des Frères Chausson
92600 ASNIERES-SUR-SEINE (FRANCE)
Telephone: 33.1.46.88.20.20
Fax: 33.1.47.91.08.91

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

9.4. Assay

Refer to the Assay Protocol Booklet of the instrument for full details on how to proceed from this point.

The antiplasmin assay of the plasmas to be tested is carried out automatically by the STA® at 405 nm as soon as the samples have been loaded. If any of the patient results fall outside the working range of the assay, the STA® automatically retests the samples in question at an appropriate dilution provided that this option has been entered in memory in the test definition (see Operator's Manual).

10/ RESULTS

The antiplasmin levels (%) of the plasmas being tested are displayed in the "Test Status" screen of the STA® (see Operator's Manual).
The STA® - Stachrom® Antiplasmin procedure has a linearity range between 0 and 130 %.

Ensure that the values obtained for the controls are within the ranges stated in the inserts provided in the control box. If the control values are outside the stated ranges, all patient results should be considered suspect. Check all components of the test system to ensure that all are functioning correctly, i.e., assay conditions, reagents, calibration, integrity of the plasmas being tested, etc. If necessary repeat the tests.

11/ LIMITATIONS

- Do not use plasmas collected with sample collection tubes containing either plasmin inhibitors (e.g., ε-aminocaproic acid (6), aprotinin...) or heparin (1), since the concentrations of these substances, as they are usually found in sample collection tubes, can interfere strongly in the test, although the same substances at therapeutic doses have little or no effect on the test.
- In certain therapeutic cases a slight interference by α_2-macroglobulin cannot be avoided, for instance, when the α_2-antiplasmin level is greatly depressed in the presence of high level of α_2-macroglobulin.

12/ EXPECTED VALUES

The normal range of antiplasmin in the adult population is usually between 80 % and 120 % (1, 13). However, each laboratory should determine its own normal range.

13/ PERFORMANCE CHARACTERISTICS

- **Specificity**
  The antiplasmin activity determined by the amidolytic method is closely related to that of α_2-antiplasmin or fast-acting antiplasmin (1, 2). The specificity of STA® - Stachrom® Antiplasmin is ensured by:
  - the very short inhibition time (30 seconds)
  - the high ionic strength of the reaction medium which minimizes interference by α_2-macroglobulin (5)
  - the inclusion of inhibitors in the reagent, such as hirudin or Polybrene® which eliminates interference by thrombin and heparin at therapeutic levels.
- **Reproducibility**
  Normal and abnormal plasmas were used for the intra-assay and inter-assay reproducibility studies. Results obtained on the STA® analyzer are shown below:

	Intra-Assay Reproducibility		Inter-Assay Reproducibility	
Plasma	Normal 1	Abnormal 1	Normal 2	Abnormal 2
n	10	10	10	10
$\bar{X}$ (%)	96.1	52.9	97.7	46.1
SD (%)	2.47	2.51	3.50	1.79
CV (%)	2.57	4.75	3.58	3.89

14/ ALTERNATIVE PROTOCOLS

The chapters 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11 and 12 are still valid for the alternative protocols.

14.1. Two-Point Method

- Reagent Preparation and Storage
  Reagent preparation is identical with that indicated in chapter 7 of this insert (do not add STA® - mini Reducer and perforated cap).
  Reconstituted stability:
  Reagent 1: 3 days at 20 °C / 14 days at 2-8 °C } in its original vial.
  Reagent 2: 14 days at 20 °C / 1 month at 2-8 °C } in its original vial.
  Do not freeze.
- Reagents and Equipment Required but not Provided
  - Sterile deionized or distilled water.
  - Physiological saline (0.15 M NaCl).
  - Glacial or 1:2 diluted acetic acid.
  - For calibration: **Unicalibrator** (Cat. No. 00625).
  - For quality control: **System Control** N + P (Cat. No. 00617).
  - Water-bath set at 37 °C or automate.
  - Stop-watch.
  - Spectrophotometer set at 405 nm.
- Calibration
  Construct a calibration curve for each test-run. Use saline (0.15 M NaCl solution) to prepare in test tubes 1:10 and 1:20 dilutions of the Unicalibrator (UC). By definition:
  - the 1:10 dilution corresponds to the assay value indicated in the UC box
  - the 1:20 dilution corresponds to half the assay value indicated in the UC box
  - saline alone corresponds to the 0 %-point.
- Patients' Plasmas and Controls
  Use saline to prepare a 1:10 dilution of the patients' plasmas and the controls (1 vol. plasma + 9 vol. 0.15 M NaCl).
- Assay
  The following instructions should be carefully adhered to:

In a plastic or glass test tube at 37 °C:	
• Test sample (standard, patient's or control)	100 µl
• Incubate approx.	1 min.
• Reagent 1	100 µl
• Mix and let incubate exactly	30 sec.
• Reagent 2	400 µl
• Mix and let incubate exactly	60 sec.
• Glacial or 1:2 diluted acetic acid	200 µl
• Mix	
Transfer to a 1-cm semi-microcuvette and read the absorbance value at 405 nm against a blank obtained by mixing in the following order:	
• Glacial or 1:2 diluted acetic acid	200 µl
• Reagent 1	100 µl
• Test sample (standard, patient's or control)	100 µl
• Reagent 2	400 µl
• Mix.	

- Results
  Use linear graph paper to plot the antiplasmin standards (%) on the x-axis and the corresponding absorbance values on the y-axis. Draw the best-fit calibration line. Interpolate the absorbance values of the patients' plasmas and the controls on the calibration line to determine their antiplasmin level (%).
  Ensure that the values obtained for the controls are within the ranges stated in the insert provided in the System Control N + P box. If the values are outside the stated ranges, all patient results should be considered suspect. Check all components of the test system to ensure that all are functioning correctly, i.e., assay conditions, reagents, calibration, integrity of the plasmas being tested, etc. If necessary, repeat the tests.

14.2. Initial Rate Method

The STA® - Stachrom® Antiplasmin kit can be adapted for use on various instruments (other than STA® analyzers) that perform tests in the kinetic mode. Adaptation protocols are available upon request from Diagnostica Stago®.

REFERENCES

1. TEGER-NILSSON A.C., FRIBERGER P., GYZANDER E.: "Determination of a new rapid plasmin inhibitor in human blood by means of a plasmin specific tripeptide substrate". Scand. J. Clin. Lab. Inv., **37**, 403-409, 1977.
2. NAITO K., AOKI N.: "Assay of α_2-plasmin inhibitor activity by means of a plasmin specific tripeptide substrate". Thromb. Res., **12**, 1147-1156, 1978.
3. WITT I.: "Antiplasmin" in "Aktuelle Diagnostik", 1-12, 1978.
4. AOKI N., SAKATA Y., MATSUDA M., TATENO K.: "Fibrinolytic states in a patient with congenital deficiency of α_2-plasmin inhibitor". Blood, **55**, 483-488, 1980.
5. GYZANDER E., TEGER-NILSSON A.C.: "Activity of the α_2-macroglobulin-plasmin complex on the plasmin specific substrate H-D-Val-Leu-Lys-p-nitroanilide". Thromb. Res., **19**, 165-175, 1980.
6. LAMMLE B., DUCKERT F.: "Different assessment of plasmin with different substrates". Thromb. Haemostasis, **43**, 112-117, 1980.
7. MATSUO O., KOSUGI T., MIHARA H., OHKI Y., MATSUO T.: "α_2-plasmin inhibitor levels in relation to modes of urokinase administration". Thromb. Res., **19**, 271-275, 1980.
8. SAMAMA M., SCHLEGEL N., CAZENAVE B., HORELLOU M.H., CONARD J., CASTEL M., DOUENIAS R.: "α_2-antiplasmin assay: amidolytic and immunological method. Critical evaluation. Results in a clinical material" in "Synthetic substrates in clinical blood coagulation assays", Lijnen H.R., Collen D., Verstraete M., La Haye: Martinus Nijhoff, 93-99, 1980.
9. LASIERRA J., DIEZ M., PERERA C., VILADES E.: "Plasmin inhibitors in different fibrinolytic treatment patterns". Haemostasis, **10**, 51-62, 1981.
10. TAMAKI T., SAKATA Y., AOKI N.: "Survival of transfused α_2-plasmin inhibitor in a patient with its congenital deficiency". Thromb. Res., **22**, 281-286, 1981.
11. WOHL R.C., SINIO L., ROBBINS K.C.: "Methods for studying fibrinolytic pathway components in human plasma". Thromb. Res., **27**, 525-535, 1982.
12. YOSHIOKA A., KAMITSUJI H., TAKASE T., IIDA Y., TSUKADA S., MIKAMI S., FUKUI H.: "Congenital deficiency of α_2-plasmin inhibitor in three sisters". Haemostasis, **11**, 176-184, 1982.
13. SAMAMA M., CONARD J., HORELLOU M.H., LECOMPTE T.: "Physiologie et exploration de l'hémostase". Paris: Doin, 198, 1990.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de fator II (protrombina)		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da atividade de fator II em plasma humano citratado baseado no tempo de protrombina utilizando plasma humano imunodepletado de fator II no sistema ACL TOP 300 (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha).

2. DEFINIÇÕES

Fator II (protrombina): é uma proteína plasmática vitamina K-dependente que durante a coagulação é convertida em fator IIa (trombina) pelo complexo protrombinase (fator Xa e fator Va).

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe do laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas;
- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa da atividade de fator II em plasma humano citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha). Vide bula em anexo.

7. REFERÊNCIAS

- Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.

8. ANEXOS

Factor II deficient plasma - 0020012200

PORTUGUÊS - Revisão do folheto 06/2014

CE

Aplicação Prevista

Plasma humano Imunodeprimido (artificialmente) em factor II para a determinação quantitativa da actividade do factor II em plasma citratado, baseado no teste do Tempo de Protrombina (TP), nos sistemas de coagulação IL.

Resumo e Princípio

FII, ou Protrombina, é uma proteína plasmática vitamina K-dependente sintetizada no fígado e que circula no plasma como uma molécula inactiva. Durante a coagulação, o FII é convertido na forma activa, factor IIa (ou trombina), pelo factor Xa. A trombina é o elemento-chave da hemostasia e realiza a sua actividade, como serina-protease, através de várias funções. A trombina é crucial para a conversão do fibrinogénio a fibrina, e é o activador de plaquetas mais importante. A trombina também activa o cofactor da coagulação factor V, factor VIII e factor XIII e quando ligada à trombomodulina é um activador potente da Proteína C.
O défice congénito de Factor II é um erro hereditário muito raro que geralmente provoca hemorragias ligeiras a moderadas.
Os défices de factor II também podem adquirir-se secundariamente devido a outras doenças, tais como as doenças hepáticas, hiperfibrinólise ou a coagulação intravascular disseminada (CID). Doentes que recebem terapêutica anticoagulante oral[1] e por defice alimentar ou de absorção de vitamina K vão ter um nível plasmático reduzido de factor II, um factor da coagulação, vitamina K-dependente.
A actividade do Factor II no plasma do doente é determinada por um teste de Tempo de Protrombina (TP) modificado. O plasma do doente é diluído e adicionado ao plasma deficitário em factor **II**. A correcção do tempo de coagulação prolongado do plasma deficitário é proporcional à concentração (% de actividade) do factor específico no plasma do doente, que se obtém a partir de uma curva de calibração.

Composição

O kit de **Factor II deficient plasma (Plasma deficitário em factor II)** é composto por:

II **Factor II deficient plasma** (Cat. No. 0020012200): 10 X 1 mL de plasma humano liofilizado, do qual se eliminou artificialmente o Factor II com um tampão e estabilizadores. A actividade residual do Factor II é inferior ou igual a 1%, enquanto todos os outros factores de têm níveis normais.

AVISOS E PRECAUÇÕES:
O material utilizado neste produto foi analisado com testes aprovados pela FDA e verificou-se a ausência de reacção ao Antigénio de Superfície da Hepatite B (HBsAg), aos anticorpos anti-HCV e anti-HIV 1/2. No entanto, deve-se manipular com precaução, como potencialmente infeccioso.[2]
Classe de risco: **nenhuma**
Frases de risco: **nenhuma**
Frases de segurança: **nenhuma**
Para uso em diagnóstico *in vitro*.

Preparação

Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 1 mL de água tipo CLRW segundo o CLSI (anteriormente NCCLS)[3] Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar. Evitar a formação de espuma.

Conservação e estabilidade do reagente

Os plasmas deficitários fechados, que ainda não foram utilizados, são estáveis até ao final do prazo de validade, que consta no rótulo, desde que conservados entre 2-8°C.
Estabilidade após reconstituição: 24 horas entre 2-8°C dentro do recipiente original ou 24 horas a uma temperatura de 15°C nos Sistemas ACL Futura/ACL Advance e ACL TOP[®].
Para obter uma estabilidade óptima retire os plasmas deficitários do aparelho e conserve-o entre 2-8°C, nos recipientes originais.

Instrumento/procedimentos de teste

Seguir as instruções da técnica de acordo com o Manual do Operador e/ou com o Manual de Aplicações adequado do instrumento IL.

Recolha e preparação da amostra

Adicionar nove partes de sangue extraído recentemente por punção venosa a uma parte de citrato trissódico. Para efectuar a recolha, o manuseamento e a conservação da amostra devem seguir-se as recomendações referidas no documento H21-A5 do CLSI.[4]

Reagentes adicionais e plasmas de controlo

Este kit não inclui os produtos abaixo mencionados, pelo que deverão ser pedidos em separado:

	Américas e Pacífico Núm. Cat.	Europa Núm. Cat.
Calibration Plasma	0020003700	
Controlo Normal	0020003120/0020003110	0020003110
Controlos Especiais de Teste Nível 2	0020012000	
PT-Fibrinogen	0009756710	
PT-Fibrinogen HS PLUS	0008469810	
ReadiPlasTin	0020301300 or 0020301400	
RecombiPlasTin 2G	0020002650 or 0020003050	
Factor Diluent	0009757600	

NOTA: Cada laboratório deve validar a sua escolha de associação reagente/aparelho.

Controlo de Qualidade

Os controlos normal e anormal são recomendados para um programa completo de controlo de qualidade.[5] O Controlo Normal e Controlos Especiais de Teste Nível 2 foram concebidos para este programa. Cada laboratório deve estabelecer a sua própria média e desvio padrão e deve estabelecer um programa de controlo de qualidade para monitorizar os testes do laboratório. Os controlos devem ser analisados pelo menos uma vez, em cada turno de 8 horas, de acordo com as boas práticas de laboratório. Consulte o manual do operador do instrumento para obter informação adicional. Consulte Westgard *et al* para identificação e resolução de situações fora do âmbito do controlo.[6,7]

Resultados

Os resultados do doente são expressos em Actividade (%), UI/mL e segundos.

Limitações/interferências

As amostras que apresentem hemólise, icterícia ou lipémia excessivas, não devem ser utilizadas para provas de coagulação, podendo surgir interferências causadas por estas situações. Consultar os folhetos informativos específicos de cada reagente para obter as informações individuais, relativas a interferências.

Valores Esperados[8]

Factor II: 79-131% (0,79-1,31 IU/mL)
Devido a várias variáveis que podem afectar os tempos de coagulação (incluindo a idade da população), cada laboratório deve estabelecer os seus intervalos de valores normais.

Características de desempenho

Precisão:
A precisão intra-ensaio e inter-ensaio foi avaliada, ao longo de vários ensaios (n=80) em aparelhos diferentes, utilizando um lote específico de reagente TP (RecombiPlasTin - Núm. Cat. 0020002900/0020003000) com amostras normais e anormais.

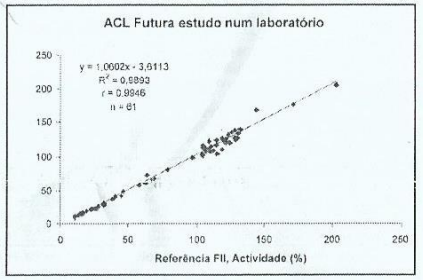
ACL 8/9/10000 ELITE/ELITE PRO	Média (% FII)	CV% (Intra-ensaio)	CV% (Inter-ensaio)
Controlo Normal	99,2	2,5	2,0
Controlos Especiais de Teste Nível 2	33,8	2,5	4,5

ACL Futura/ ACL Advance	Média (% FII)	CV% (Intra-ensaio)	CV% (Inter-ensaio)
Controlo Normal	86,8	3,9	4,7
Controlos Especiais de Teste Nível 2	25,9	6,2	3,1

Família ACL TOP	Média (% FII)	CV% (Intra-ensaio)	CV% (Inter-ensaio)
Controlo Normal	130,6	2,8	4,3
Controlos Especiais de Teste Nível 2	28,6	3,3	4,8

Correlação:
Num estudo clínico, (n=61) obtiveram-se os seguintes dados e gráfico, no ACL Futura utilizando um lote específico de reagente TP (RecombiPlasTin):

Sistema	declive	intersecção	r	Método de referência
ACL Futura	1,0602	-3,6113	0,9946	HemosIL Plasma Deficitário em Factor II



Em estudos de correlação (n= 60 a 78), foi atingido o critério de aceitação de r ≥ 0,95 e intervalo 0,85-1,15.

Bibliography / Literatur / Bibliografía / Bibliographie / Bibliografia /Bibliografia / Litteratur / Litteraturförteckning /

1. Biggs R, Rizza C. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. III ed. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, 1984.
2. Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Fourth Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No. 22.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5
5. Zucker S, Cathey MH, and West B. Preparation of Quality Control Specimen for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.
6. Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control; Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Determination of Factor Coagulant Activities. Approved Guideline. CLSI Publication H48-A; Vol. 17 No. 4.
8. Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, Vol. 2, 1999: p1575t, ISBN 0-683-18242-0.

The Instrumentation Laboratory logo, HemosIL, ACL, ACL Futura, ACL Advance, ACL ELITE and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory Company and/or one of its subsidiaries or parent companies, and may be registered in the United States Patent and Trademark Office and in other jurisdictions.
©2009 Instrumentation Laboratory.

Issued June 2014
Printed in U.S.A.

Instrumentation Laboratory
Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 (USA)
Instrumentation Laboratory SpA - V.le Monza 338 - 20128 Milano (Italy) EC REP

303677 R4 06/2014

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de fator X		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da atividade de fator X em plasma humano citratado baseado no teste de tempo de protrombina, utilizando plasma imunodepletado de fator X, no sistema ACL TOP 300 (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha).

2. DEFINIÇÕES

Fator X: é uma proteína plasmática vitamina K-dependente que durante a coagulação é convertida em sua forma ativa (fator Xa) pelo fator tissular/fator VIIa (FT/FVIIa) ou fator IXa/fator VIIIa (FIXa/FVIIIa).

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas de amostras relacionadas à pesquisa.

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe do laboratório de hemostasia da Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas;
- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa da atividade de fator X em plasma humano citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Werfen Instrumentation Laboratory, Barcelona, Espanha). Vide bula em anexo.

7. REFERÊNCIAS

- Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.

8. ANEXOS

Factor X deficient plasma - 0020010000

PORTUGUÊS - Revisão do folheto 07/2012

CE

Aplicação Prevista

Plasma humano Imunodeprimido (artificialmente) em factor X para a determinação quantitativa da actividade do factor X em plasma citratado, baseado no teste do Tempo de Protrombina (TP), nos sistemas de coagulação IL.

Resumo e Princípio

O factor X humano é uma glicoproteína plasmática de cadeia bicatenária, vitamina K-dependente, que é sintetizada no fígado. Durante a coagulação o factor X é activado proteoliticamente a serina protease, que é o factor Xa, quer pelo factor intrínseco, complexo Xase (factor IXa, factor VIIIa, superfícies celulares e iões cálcio) ou pelo factor extrínseco, complexo Xase (factor VIIa, factor tecidular, superfícies celulares e iões cálcio). O Factor Xa, associado ao cálcio, ao Factor Va e à superfície fosfolipídica com carga negativa, formam o complexo protrombinase, responsável pela rápida conversão da protrombina em trombina.

O défice congénito de Factor X é um erro hereditário raro que pode provocar hemorragias após extrações dentárias e outras cirurgias. Os défices de factor X também podem adquirir-se secundariamente devido a outras doenças, tais como a amiloidose sistémica, doenças hepáticas, hiperfibrinólise ou a coagulação intravascular disseminada (CID). Doentes que recebem terapêutica anticoagulante oral[1] e por défice alimentar ou de absorção de vitamina K vão ter um nível plasmático reduzido de factor X, um factor da coagulação, vitamina K-dependente.

A actividade do Factor X no plasma do doente é determinada por um teste de Tempo de Protrombina (TP) modificado. O plasma do doente é diluído e adicionado ao plasma deficitário em factor X. A correcção do tempo de coagulação prolongado do plasma deficitário é proporcional à concentração (% de actividade) do factor específico no plasma do doente, que se obtém a partir de uma curva de calibração.

Composição

O kit de **Factor X deficient plasma (Plasma deficitário em factor X)** é composto por:

[X] **Factor X deficient plasma** (Núm. Cat. 0020010010): 10 frascosx 1 mL de plasma humano liofilizado, do qual se eliminou artificialmente o Factor X com um tampão e estabilizadores. A actividade residual do Factor X é inferior ou igual a 1%, enquanto todos os outros factores de têm níveis normais.

AVISOS E PRECAUÇÕES:
O material utilizado neste produto foi analisado com testes aprovados pela FDA e verificou-se a ausência de reacção ao Antigénio de Superfície da Hepatite B (HBsAg), aos anticorpos anti-HCV e anti-HIV 1/2. No entanto, deve-se manipular com precaução, como potencialmente infeccioso.[2]
Classe de risco: **nenhuma**
Frases de risco: **nenhuma**
Frases de segurança: **nenhuma**
Para uso em diagnóstico *in vitro*.

Preparação

Dissolver o conteúdo de cada recipiente em 1 mL de água destilada CLSI (anteriormente NCCLS).[3] Fechar o recipiente e homogeneizar suavemente. Verificar se o produto fica completamente dissolvido. Conservar o reagente entre 15 e 25°C durante 30 minutos. Misturar invertendo o recipiente, antes de utilizar. Não agitar. Evitar a formação de espuma.

Conservação e estabilidade do reagente

Os plasmas deficitários fechados, que ainda não foram utilizados, são estáveis até ao final do prazo de validade, que consta no rótulo, desde que conservados entre 2-8°C.
Estabilidade após reconstituição: 24 horas entre 2-8°C dentro do recipiente original ou 24 horas a uma temperatura de 15°C nos Sistemas ACL Futura/ACL Advance e Sistemas Família ACL TOP[8].
Para obter uma estabilidade óptima retire os plasmas deficitários do aparelho e conserve-o entre 2-8°C, nos recipientes originais.

Instrumento/procedimentos de teste

Seguir as instruções da técnica de acordo com o Manual do Operador e/ou com o Manual de Aplicações adequado do instrumento IL.

Recolha e preparação da amostra

Adicionar nove partes de sangue extraído recentemente por punção venosa a uma parte de citrato trissódico. Para efectuar a recolha, o manuseamento e a conservação da amostra devem seguir-se as recomendações referidas no Documento H21-A5 da CLSI.[4]

Reagentes adicionais e plasmas de controlo

Os reagentes seguintes não são fornecidos com o kit e têm de ser adquiridos separadamente

	América e Anel do Pacífico Cat. No.		Europa Cat. No.
Calibration Plasma		0020003700	
Normal Control	0020003120		0020003110
Special Test Control Level 2		0020012000	
PT-Fibrinogen		0009756710	
PT-Fibrinogen HS		0008468210	
PT-Fibrinogen HS PLUS		0008469810	
RecombiPlasTin	0020002900	or	0020003000
RecombiPlasTin 2G	0020002950	or	0020003050
Factor Diluent		0009757600	

NOTA: Cada laboratório deve validar a sua escolha de associação reagente/aparelho.

Controlo de Qualidade

São recomendados controlos normais e anormais para um programa completo de controlo de qualidade.[5] O Normal Control e Special Test Control Level 2 foram concebidos para este programa. Cada laboratório deve estabelecer a sua própria média e desvio padrão e deve efectuar um programa de controlo de qualidade para monitorizar os seus resultados. Os controlos devem ser analisados uma vez em cada turno de 8 horas, de acordo com a norma vigente no Laboratório. Ver Manual do Operador para mais informações. Consultar a publicação de Westgard e col. para identificar e solucionar situações anormais do Controlo de Qualidade.[6]

Resultados

Os resultados do doente são expressos em Actividade (%), UI e segundos.

Limitações/Interferências

As amostras que apresentem hemólise, icterícia ou lipémia excessivas, não devem ser utilizadas para provas de coagulação, podendo surgir interferências causadas por estas situações. Consultar os folhetos informativos específicos de cada reagente para obter as informações individuais, relativas a interferências.

Valores Esperados[7]

Factor X: 77-131% (0,77-1,31 UI)
Devido a várias variáveis que podem afectar os tempos de coagulação (incluíndo a idade da população), cada laboratório deve estabelecer os seus intervalos de valores normais.

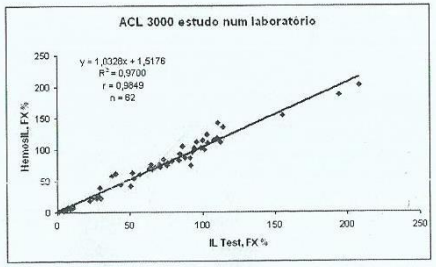
Características de desempenho

Precisão:
A precisão intra-análise e inter-análise foi avaliada ao longo de múltiplas análises (n=80) em instrumentos diferentes utilizando lotes específicos de reagente PT e amostras normais e anormais.

Familia ACL	Média (% FX)	CV% (Intra-ensaio)	CV% (Inter-ensaio)
Normal	113,2	3,5	4,6
Anormal Baixo	38,9	4,1	6,0
ACL Futura/ ACL Advance	**Média (% FX)**	**CV% (Intra-ensaio)**	**CV% (Inter-ensaio)**
Normal	96,3	4,2	4,5
Anormal Baixo	38,9	5,0	6,1
Familia ACL TOP	**Média (% FX)**	**CV% (Intra-ensaio)**	**CV% (Inter-ensaio)**
Normal	114,6	1,8	1,3
Controlos Especiais de Teste Nível 2	38,3	1,9	2,0

Correlação:
Num estudo clínico (n=62), foram obtidos os dados seguintes e o gráfico, num ACL 3000 utilizando um lote específicos de reagente PT:

Sistema	declive	intersecção	r	Método de referência
ACL 3000	1,0328	1,5176	0,9849	IL Test Plasma Deficitário em Factor X



Em estudos de correlação (n=98), foi atingido o critério de aceitação de r ≥ 0,95 e intervalo 0,85-1,15. Um estudo adicional de correlação no ACL TOP vs. ACL Advance (n=110), resultou num r > 0,95 e num declive de 0,97.

Bibliography / Literatur / Bibliografía / Bibliographie / Bibliografia /Bibliografia / Litteratur / Litteraturförteckning /

1. Biggs R, Rizza C. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis. III ed. Oxford, England: Blackwell Scientific Publications, 1984.
2. Richmond JY, McKinney RW eds. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 4th Edition, 1999.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Fourth Edition, CLSI Document C3-A4; Vol. 26 No. 22.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline - Fifth Edition, CLSI Document H21-A5; Vol. 28 No. 5
5. Zucker S, Cathey MH, and West B. Preparation of Quality Control Specimen for Coagulation, Am. J. Clin. Pathol. 1970; 53: 924-927.
6. Westgard JO, and Barry PL. Cost-Effective Quality Control; Managing the Quality and Productivity of Analytical Process, AACC Press 1986.
7. Wintrobe's Clinical Hematology, Tenth Edition, Vol. 2, 1999; p1575t, ISBN 0-683-18242-0.

The Instrumentation Laboratory logo, HemosIL, ACL, ACL Futura, ACL ELITE and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory Company and/or one of its subsidiaries or parent companies, and may be registered in the United States Patent and Trademark Office and in other jurisdictions.
©2009 Instrumentation Laboratory
Issued July 2012

Instrumentation Laboratory
Instrumentation Laboratory Company - Bedford, MA 01730-2443 (USA)
Instrumentation Laboratory SpA - V.le Monza 338 - 20128 Milano (Italy) EC REP

303662 R3 07/2012

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de fator V		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da atividade de fator V em plasma humano citratado, utilizando plasma imunodepletado de fator V.

2. DEFINIÇÕES

Fator V: é um cofator da coagulação que catalisa a conversão do fator II (protrombina) em fator IIa (trombina). A trombina é capaz de ativar o fator V em fator Va.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de malária do IPCCB de amostras relacionadas à pesquisa;

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

- **Preparo de plasma humano deficiente em fator V**

a) As amostras de sangue de doadores voluntários são adicionadas individualmente em tubo de plástico contendo oxalato de sódio 0,1M;
b) Centrifugar a 2500*g*, durante 15 minutos; a temperatura ambiente, para obtenção de plasma humano oxalatado;
c) Incubar o plasma humano oxalatado a 37º C por 24 – 36 horas;
d) Realizar o teste de tempo de protrombina (TP) de tempo em tempo até obter um TP de 60-70 segundos;
e) Ao obter esse TP, fazer *pool* de plasma humano oxalatado.

- **Preparo da curva padrão**

a) Fazer diluições 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 e 1/2560 do plasma normal humano citratado em tampão tyrode (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, NaH_2PO_4, $MgCl_2$ 1mM, HEPES 10 mm, albumina bovina 0,35%, dextrose 5,6 mM, apyrase 0,02%, PGE_1, pH, 7,4).

- **Preparo da amostra do paciente e dos controles**

a) Fazer diluição 1/10 do plasma citratado humano (amostra a ser analisada) em tampão tyrode (pH=7,4).

- **Procedimento**

Em um tubo de vidro ou de plástico 37º C:
a) Adicione 100 µL de plasma deficiente em fator V;
b) Adicione 100 µL da amostra (plasma normal humano -curva, controle ou paciente) diluída;
c) Incube por 1 minuto a 37ºC;
d) Adicione 200 µL do extrato de cérebro contendo Cl_2Ca (reagente 1 do teste do tempo de trombina (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França).
e) Determinar o tempo de coagulação em segundos.

7. REFERÊNCIAS

- Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.

- Denson KWE. Appendix 1. The preparation of general reagentes and coagulation factors. In: Biggs R, editor. Human blood Coagulation, haemostasis and thrombosis. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific; 1976. p. 661–2.

- Denson KWE. Appendix 2. The preparation of general reagentes and coagulation factors. In: Biggs R, editor. Human Blood Coagulation Haemostasis and Thrombosis. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific; 1976. p. 702–4.

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de fator VII		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da atividade de fator VII em plasma humano citratado, utilizando plasma imunodepletado de fator VII.

2. DEFINIÇÕES

Fator VII: é uma proteína plasmática vitamina K-dependente que forma com o fator tissular um complexo, o qual ativa tanto o fator X como o fator IX.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de malária do IPCCB de amostras relacionadas à pesquisa;

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa da atividade de fator VII em plasma humano citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França). Vide bula em anexo. O protocolo alternativo segue abaixo:

- **Preparo da curva padrão**

a) Fazer diluições 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280 e 1/2560 do plasma normal humano citratado em tampão tyrode (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, NaH_2PO_4, $MgCl_2$ 1mM, HEPES 10 mm, albumina bovina 0,35%, dextrose 5,6 mM, apyrase 0,02%, PGE_1, pH, 7,4).

- **Preparo da amostra do paciente e dos controles**

a) Fazer diluição 1/10 do plasma citratado humano (amostra a ser analisada) em tampão tyrode (pH=7,4).

- **Procedimento**

Em um tubo de vidro ou de plástico a 37º C:

a) Adicione 100 µL de plasma deficiente em fator V;
b) Adicione 100 µL da amostra (plasma normal humano -curva, controle ou paciente) diluída;
c) Incube por 1 minuto a 37ºC;
d) Adicione 200 µL do extrato de cérebro contendo Cl_2Ca (reagente 1 do teste do tempo de trombina (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França).
e) Determinar o tempo de coagulação em segundos.

7. REFERÊNCIAS

- Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.

8. ANEXOS

STA - DEFICIENT VII

Plasma imuno-deplectado para o doseamento do factor VII

• Kit de 6 frascos

(REF 00743) IVD CE

Março 2015 Português 8

1/ FINALIDADE

O **STA® - Deficient VII** é um plasma utilizado para a determinação da actividade do factor VII (proconvertina) por meio de qualquer método de doseamento que implique o emprego de um plasma desprovido de factor VII (1), nos STA-R® e STA Compact®.

2/ RESUMO E EXPLICAÇÃO

• **Bioquímica**

O factor VII é uma glicoproteína vitamina K dependente e cujo peso molecular corresponde, aproximadamente, a 50 000 daltons (7). Sintetizado no fígado é constituído por uma única cadeia polipeptídica (7). A taxa plasmática é de cerca de 0,50 mg/l e a semi-vida breve (4 a 6 horas) (7).

O factor VII (F. VII) forma com o factor tissular (FT) um complexo equimolecular na presença de iões de cálcio (7). No centro deste complexo, o factor VII pode ser activado em factor VIIa pelos factores Xa, IXa, XIIa, pela trombina e pelo próprio complexo FT/F. VIIa (8).

O complexo FT/F. VIIa activa tanto o factor X como o factor IX (7).

O complexo FT/F. VIIa é inibido pelo TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Num primeiro tempo, o TFPI liga-se ao factor Xa e, em seguida, ao complexo FT/F. VIIa, formando um complexo quaternário inactivo (5). O complexo FT/F. VIIa poderá ser inibido pela antitrombina na presença de heparina (5).

• **Variações patológicas ou iatrogénicas**

– Deficiência congénita em factor VII (7, 10). No caso de determinadas variantes, a taxa de actividade do factor VII doseado depende do tipo de tromboplastina utilizada (4, 7).

– Deficiência adquirida associada à deficiência de outros factores da coagulação (2):
  - carência de fornecimento ou de absorção da vitamina K (doença hemorrágica do recém-nascido, icterícia por retenção, tratamento pelos antibióticos)
  - tratamento pelos medicamentos anti-vitamina K
  - insuficiência hepática
  - fibrinólise
  - coagulação intravascular disseminada (CIVD).

– Taxas elevadas de factor VII são, por vezes, associadas a um risco acrescido de doença cardiovascular (5, 10).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

O princípio de quantificação consiste em medir, em presença de STA® - Néoplastine®, o tempo de coagulação de um sistema onde todos os factores são presentes e em excesso (fornecidos pelo **STA® - Deficient VII**) à excepção do factor VII fornecido pela amostra testada.

4/ COMPOSIÇÃO

Cada kit de STA® - Deficient VII contém uma etiqueta com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do kit, referência do reagente e prazo de validade.

STA® - Deficient VII: plasma humano citratado, liofilizado, desprovido de factor VII por imuno-adsorção específica.

Este reagente contêm produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que é requerida a utilização de plasma humano na preparação deste reagente, são utilizados métodos validados para a detecção do antigénio HBs e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV 1 e anti-HIV 2, e o resultado obtido é negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, este reagente de origem biológica deve ser manipulado com as precauções habitualmente empregues quando se trata de produto potencialmente infeccioso.

5/ PRECAUÇÕES

O kit deve ser conservado a uma temperatura entre 2-8 °C. Exclusivamente destinado para a utilização de diagnóstico *in vitro*. Este reagente só pode ser utilizado por profissionais habilitados para o efeito e devidamente autorizados pelo laboratório.

Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual do operador" relativo ao instrumento utilizado.

Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação dos resíduos deverá processar-se de acordo com a regulamentação local em vigor.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.

• Colher o sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue.

• Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g.

• Conservação do plasma em tubo de plástico:

4 horas a 20 ± 5 °C
15 dias a –20 °C (9)
1 mês a –80 °C (9)

} se congelado rapidamente. Colocar a amostra a 37 °C o tempo necessário e suficiente para a descongelação total.

Não conservar a 2-8 °C já que o factor VII é susceptível de se activar a esta temperatura (sistema de calicreínas) (3).

7/ PREPARAÇÃO E CONSERVAÇÃO DO REAGENTE

• **Preparação**

Reconstituir cada frasco com 1 ml de água destilada. Deixar o reagente estabilizar, durante 30 minutos, à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, agitar ligeiramente para obter uma solução homogénea.

• **Conservação**

Liofilizado: a 2-8 °C, até ao prazo de validade indicado na embalagem.

Reconstituído: 8 horas em STA-R® e STA Compact®.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

• **STA® - Néoplastine® CI** (REF 00605, 00666), **STA® - Néoplastine® CI Plus** (REF 00606, 00667) ou **STA® - Néoplastine® R** (REF 00665).

• **STA® - Owren-Koller** (REF 00360).

• **STA® - Unicalibrator** (REF 00675).

• **STA® - System Control** N + P (REF 00678): controlos normal e anormal.

• STA-R® ou STA Compact®.

• Agitador magnético (REF 27425).

• STA® - mini Reducer REF 00797 (STA® - Néoplastine® CI ⑤ ou CI Plus ⑤) ou STA® - maxi Reducer REF 00801 (STA® - Néoplastine® CI ⑩, CI Plus ⑩ ou R).

• Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração

A calibração é realizada por meio do STA® - Unicalibrator. Preparar o STA® - Unicalibrator e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras da etiqueta. Os diferentes pontos da gama de calibração serão automaticamente feitos pelo aparelho em STA® - Owren-Koller conforme a configuração do teste.

A calibração pode ser visualizada no ecrã do aparelho a partir do menu "Calibration" (ver o "Manual do Operador").

9.2. Plasmas a testar

Os plasmas a testar são utilizados em estado puro. São introduzidos no aparelho (ver o "Manual do Operador" do aparelho utilizado). As diluições em STA® - Owren-Koller são realizadas automaticamente pelo instrumento.

Seleccionar o(s) teste(s) a efectuar nos plasmas de paciente.

9.3. Controlos

Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Utilizar o dispositivo STA® - System Control N + P. Preparar estes controlos e transferir para o instrumento as informações do código de barras de cada uma das duas etiquetas. Estes controlos são utilizados em estado puro; a diluição em STA® - Owren-Koller é realizada automaticamente pelo aparelho.

9.4. Ensaio

Para a realização do ensaio, consulte o protocolo descrito no "Standardized Operating Procedures" do instrumento.

A quantificação do factor VII dos plasmas a testar é feita automaticamente pelo aparelho à medida que as amostras são carregadas.

Se o resultado obtido para um determinado plasma se situar fora do intervalo de medição, o instrumento realiza automaticamente a diluição apropriada para esta amostra e repete a determinação, desde que esta funcionalidade tenha sido definida na configuração do teste (ver o "Manual do Operador").

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

10/ RESULTADOS

O nível do factor VII das amostras testadas é visualizada em tempo real, em percentagem (%), no painel de bordo do instrumento (ver o "Manual do Operador"). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos intervalos indicados nas etiquetas destes controlos, verificar o funcionamento correcto de todo o sistema: condições operatórias, reagentes, calibração, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir os ensaios.

11/ LIMITES DO MÉTODO

Os inibidores da trombina (ex. hirudine, argatroban...) presentes na amostra a testar são susceptíveis de levar a subestimação do nível de factor VII desta amostra.

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

O nível plasmático do factor VII, no adulto, está geralmente compreendido entre 55 e 170 % (6). No entanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais.

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

- **Zona de medição - Limite de detecção**
  Com uma diluição do plasma a testar de 1/10, o método em STA® é, com o reagente STA® - Néoplastine® CI Plus, linear até 200 % do factor VII e o limite de detecção situa-se a 6 %.
- **Reprodutibilidade**
  Estudos de reprodutibilidade intra-série e inter-séries foram realizados com o reagente STA® - Néoplastine® CI. Os resultados obtidos no STA® são indicados no quadro seguinte:

	Reprodutibilidade intra-ensaio		Reprodutibilidade inter-ensaio	
Amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
n	21	21	10	10
$\bar{X}$ (%)	102	51	113	44
DS (%)	2,4	1,5	3,0	2,3
CV (%)	2,4	3,0	2,7	5,3

BIBLIOGRAFIA

1. SOULIER J.P., LARRIEU M.J.:
   "Etude analytique des temps de Quick allongés. Dosages de prothrombine, de proconvertine et de proaccélérine". Sang, **23**, 7, 549-559, 1952.
2. CAEN J., LARRIEU M.J., SAMAMA M.:
   "L'hémostase. Méthodes d'exploration et diagnostic pratique". Paris: L'Expansion scientifique, 347, 1975.
3. GJONNAESS H., FAGERHOL M.K.:
   "Studies on coagulation and fibrinolysis in pregnancy". Acta Obstet. Gynecol. Scand., **54**, 363-367, 1975.
4. CROZE M., BRIZARD C.P.:
   "Factor VII Padua 1". Haemostasis, **11**, 185-188, 1982.
5. TAPON-BRETAUDIERE J.:
   "Le facteur VII, plaque tournante de la coagulation". Option Bio, suppl. 199, 1998.
6. MARIANI G., LIBERTI G., D'ANGELO T., LO COCO L.:
   "Factor VII activity and antigen". Laboratory Techniques in Thrombosis - ECAT assay procedures. Dordrecht: Kluwer academic publishers, 99-106, 1999.
7. GIANSILY M., SCHVED J.F.:
   "Les déficits constitutionnels en facteur VII". Hématologie, **6**, 266-271, 2000.
8. KONIGSBERG W., KIRCHHOFER D., RIEDERER M.A., NEMERSON Y.:
   "The TF:VIIa complex: clinical significance, structure-function relationships and its role in signaling and metastasis". Thromb. Haemostasis, **86**, 757-771, 2001.
9. WOODHAMS B., GIRARDOT O., BLANCO M.J., COLESSE G., GOURMELIN Y.:
   "Stability of coagulation proteins in frozen plasma". Blood Coag. Fibrinolysis, **12**, 229-236, 2001.
10. PERRY D.J.:
    "Review - Factor VII Deficiency". Br. J. Haematol., **118**, 689-700, 2002.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
webmaster@stago.com

As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos de propriedade intelectual, © 2015, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logotipos e/ou os nomes dos produtos de Diagnostica Stago são marcas registadas. Português

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de plasminogênio		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da atividade de plasminogênio em plasma humano citratado, em substrato sintético cromógeno por método amidolítico.

2. DEFINIÇÕES

Plasminogênio: é uma proenzima plasmática inativa que é convertida em plasmina pelos ativadores de plaminogênio do tipo tecidual e uroquinase com a função de degradar a fibrina

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de malária do IPCCB de amostras relacionadas à pesquisa;

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa da atividade de plasminogênio em plasma humano citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França). Vide bula em anexo. O protocolo alternativo segue abaixo:

- **Preparo da curva padrão**

a) Fazer diluições 100%, 50%, 25% e 0% do plasma normal humano citratado em tampão tyrode (NaCl 137mM, KCl 2,7 mM, NaH_2PO_4, $MgCl_2$ 1mM, HEPES 10 m/m, albumina bovina 0,35%, dextrose 5,6 mM, apyrase 0,02%, PGE_1, pH, 7,4) como segue:

Padrão de plasminogênio	**Plasma normal citratado *(pool)***	**Tampão tyrode (pH=7,4)**
100%	100 µL	500 µL
50%	200 µL do padrão 100%	200 µL
25%	200 µL do padrão 200%	200 µL
0%	-	200 µL

- **Procedimento**

Em um tubo de vidro ou de plástico:

a) Adicione 200 µL da amostra (plasma normal humano -curva, ou paciente);
b) Incube por 2-4 minutos a 37ºC;
c) Adicione 200 µL do reagente 1 (estreptoquinase) (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França);
d) Misture e incube por 2 minutos a 37ºC;
e) Adicione 200 µL do reagente 2 (substrato cromógeno) (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França);
f) Misture e incube por 1 minuto a 37ºC;
g) Adicione 200 µL do ácido glacial 50%.

Faça a leitura da absorbância a 405 nm contra um branco preparado da seguinte maneira:

a) 200 µL do ácido glacial 50%;
b) 200 µL da diluição padrão (100%);
c) Adicione 200 µL do reagente 1 (estreptoquinase) (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França);
d) Adicione 200 µL do reagente 2 (substrato cromógeno) (Diagnostica Stago S.A.S., Asnières sur Seine, França).

7. REFERÊNCIAS

- Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.

- Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. Medicina. 2001; 34:229-237.

8. ANEXOS

STA - STACHROM® PLASMINOGEN

Determinação colorimétrica do plasminogénio

- Dispositivo contendo:
  - 6 frascos de Reagente 1 (Streptokinase)
  - 6 frascos de Reagente 2 (Substrate)

(REF 00658) IVD CE

Fevereiro 2015 Português 8

1/ FINALIDADE

Quantificação da actividade do plasminogénio no plasma em substrato sintético cromogéneo (4) por método amidolítico, em STA-R® e STA Compact®.

2/ ACERCA DO PLASMINOGÉNIO

- **Bioquímica do plasminogénio**

O plasminogénio é uma glicoproteína de peso molecular aproximado de 90 000 daltons (7). É sintetizado ao nível do fígado e constitui uma única cadeia peptídica (7). No plasma, o plasminogénio existe sob a forma livre ou ligado a HRGP (histidine rich glycoprotein), α_2-antiplasmina ou fibrinogénio (7). O aminoácido N-terminal do plasminogénio nativo é o ácido glutâmico (Glu-plasminogénio) (9). O Lys-plasminogénio cujo aminoácido N-terminal é a lisina é produzido sob a acção da plasmina (9).

Sob a influência de activadores tecidulares ou plasmáticos, o plasminogénio é transformado em plasmina por clivagem da molécula, ao nível de uma ligação arginina-valina: formação de duas cadeias ligadas entre si por pontes dissulfureto (7). O ponto activo da plasmina composto de um resíduo de serina está situado na parte C-terminal do plasminogénio (7). O papel essencial da plasmina é degradar a fibrina e, secundariamente, o fibrinogénio (7).

- **Interesse clínico**

As deficiências constitucionais em plasminogénio podem ser de dois tipos:

– quantitativas ou de tipo I: apresentam uma redução simultânea das taxas funcional e antigénica. Estas deficiências são os mais frequentes;

– qualitativas ou de tipo II: são caracterizadas por uma taxa funcional significativamente mais baixa que a taxa antigénica (8).

A deficiência em plasminogénio é, para certos autores, um factor de risco trombótico. Para outros, se a deficiência em plasminogénio não for retida isoladamente como trombogénio, constituirá um factor que aumenta o risco clínico de uma outra anomalia da hemostase (8).

A concentração plasmática do plasminogénio aumenta nos estados infecciosos e inflamatórios, diminui na afecção hepática e em tratamentos trombolíticos (9).

3/ PRINCÍPIO DO TESTE

A quantificação do plasminogénio foi realizada segundo uma técnica em dois tempos:

– um excesso de estreptoquinase (Reagente 1) é adicionado ao plasma diluído contendo o plasminogénio a quantificar: forma-se um complexo plasminogénio-estreptoquinase que possui uma actividade "plasmin-like" (1);

– a quantidade de complexo formado é quantificada pela sua acção sobre o substrato sintético CBS 30.41 (Reagente 2). A libertação de paranitro-anilina é medida a 405 nm.

Nestas condições de quantificação, a reacção é insensível aos inibidores plasmáticos (2, 3).

4/ COMPOSIÇÃO

Cada dispositivo de STA® - Stachrom® Plasminogen contém uma etiqueta com código de barras. Este código de barras contém as seguintes informações: número de lote, referência do dispositivo, referência dos reagentes, prazo de validade.

- **Reagente 1**: estreptoquinase titulada aproximadamente a 15 000 UI por frasco, liofilizada. Esta estreptoquinase é estabilizada por albumina de origem humana.
- **Reagente 2**: substrato cromogéneo CBS 30.41 H-D-But-CHA-Lys-pNA, 2 AcOH, aproximadamente 16,5 µmoles por frasco (5), liofilizado.

Alguns dos reagentes deste dispositivo contêm produtos de origem humana e/ou animal. Sempre que se utilizou plasma humano na preparação destes reagentes, procedeu-se à detecção do antigénio HBs, e dos anticorpos anti-HCV, anti-HIV1 e anti-HIV 2, cujo resultado deu negativo. No entanto, nenhum método oferece uma garantia total da inexistência de agentes infecciosos. Assim, estes reagentes de origem biológica devem ser manipulados com as precauções habitualmente utilizadas para produtos potencialmente infecciosos.

5/ AVISOS E PRECAUÇÕES

O dispositivo intacto deve ser conservado temperatura a 2-8 °C. Exclusivamente destinado utilização para diagnóstico *in vitro*. Estes reagentes só podem ser utilizados por pessoal habilitado para o efeito, autorizado pelo laboratório. Utilizar apenas reagentes da mesma embalagem ou do mesmo lote.

O dispositivo STA® - Stachrom® Plasminogen destina-se especificamente aos aparelhos da linha STA® adequados para estes reagentes. Antes de utilizar, ler atentamente o "Manual do Operador" relativo ao instrumento utilizado.

Manipular com precaução os reagentes e as amostras dos pacientes. A eliminação de resíduos deverá processar-se de accordo com a regulamentação local em vigor.

6/ COLHEITA E TRATAMENTO DA AMOSTRA

A colheita deve ser realizada em conformidade com as recomendações relativas a exames de hemostase.

- Colher o sangue em solução de citrato trissódico 0,109 M: 1 vol. de citrato para 9 vol. de sangue.
- Centrifugação: 15 minutos a 2000-2500 g.
- Conservação do plasma: 24 horas a 20 ± 5 °C
  1 mês a –20 °C. Colocar a amostra a 37 °C o tempo necessário e suficiente para a descongelação total.

7/ CONSERVAÇÃO E PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Quando conservados a 2-8 °C na embalagem de origem, os reagentes mantêm-se estáveis até ao prazo de validade indicado na embalagem.

- **Reagente 1**

Reconstituir cada frasco com 3 ml de água destilada. Deixar a solução estabilizar 60 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, agitar suavemente.

Estabilidade após reconstituição: 7 dias no frasco de origem nos STA-R® e STA Compact®.

- **Reagente 2**

Reconstituir cada frasco com 3 ml de água destilada. Deixar a solução estabilizar 60 minutos à temperatura ambiente (18-25 °C). Em seguida, agitar suavemente.

Estabilidade após reconstituição: 7 dias no frasco de origem nos STA-R® e STA Compact®.

Não congelar.

8/ REAGENTES E MATERIAL AUXILIARES

- **STA® - Owren-Koller** (REF 00360).
- **STA® - Unicalibrator** (REF 00675).
- **STA® - System Control** N + P (REF 00678): controlos normal e anormal.
- STA-R® ou STA Compact®.
- Equipamento habitualmente utilizado nos laboratórios de análises clínicas.

9/ MODO DE FUNCIONAMENTO

9.1. Calibração

A calibração é efectuada por meio do STA® - Unicalibrator. Preparar o STA® - Unicalibrator e transferir para o aparelho as informações contidas no código de barras da etiqueta. Os diferentes pontos da gama de calibração serão efectuados automaticamente pelo instrumento em STA® - Owren-Koller, segundo as definições registadas na configuração do teste.

A calibração pode ser visualizada no ecrã a partir do menu "Calibration" (ver o "Manual do Operador").

9.2. Plasmas a testar

Os plasmas a testar são utilizados em estado puro. São introduzidos no instrumento. Basta introduzi-los no aparelho (ver o "Manual do Operador" do aparelho utilizado). As diluições em STA® - Owren-Koller são realizadas automaticamente pelo aparelho.

Seleccionar o(s) teste(s) a efectuar no plasmas dos pacientes.

9.3. Controlos

Os controlos são necessários para verificar a exactidão e a reprodutibilidade dos resultados. Utilizar o STA® - System Control N + P. Preparar estes controlos e transferir para o aparelho as informações contidas nos códigos de barras da etiqueta. Estes controlos são utilizados em estado puro; a diluição em STA® - Owren-Koller é realizada automaticamente pelo aparelho.

9.4. Ensaio

Para a realização da quantificação consultar o protocolo descrito no "Standardized Operating Procedures" do instrumento.

A quantificação do plasminogénio dos plasmas a testar é realizada automaticamente pelo aparelho a 405 nm, à medida que as amostras vão sendo carregadas. Se o resultado obtido para um determinado plasma se situar fora do intervalo de medição, o instrumento realiza automaticamente a diluição apropriada para esta amostra e repete a determinação, desde que esta funcionalidade tenha sido definida na configuração do teste (ver o "Manual do Operador").

10/ RESULTADOS

A taxa de plasminogénio das amostras testadas é visualizada em tempo real, em percentagem (%) no ecrã do instrumento (ver o "Manual do Operador"). O resultado deve ser interpretado em função do estado clínico e biológico do doente.

Se o aparelho indicar que os resultados obtidos para os controlos se situam fora dos âmbitos indicados nas etiquetas incluídas no dispositivo, STA® - System Control N + P, verificar o funcionamento correcto de todo o sistema: condições operatórias, reagentes, aferição, plasmas a testar, etc. Se necessário, repetir as quantificações.

11/ LIMITAÇÕES DO MÉTODO

- Foi demonstrado que a hemoglobina, a bilirrubina, os triglicéridos e os produtos de degradação da fibrina não interferiam na quantificação até às concentrações de 7 g/l, 900 µmoles/l, 10 g/l e 130 µg/ml, respectivamente.
- A presença de aprotinina na recolha dá origem a que a taxa de plasminogénio seja subestimada.

12/ INTERVALO DE REFERÊNCIA

A taxa plasmática de plasminogénio está geralmente compreendida, no adulto, entre 80 e 120 % (6). No entanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores normais.

No recém-nascido, a taxa de plasminogénio é habitualmente baixa (9). A quantificação do plasminogénio é importante na interpretação biológica da taxa dos produtos de degradação do fibrinogénio (PDF), em coagulações intravasculares disseminadas (CIVD) (4).

13/ CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO

- **Zona de medição - Limite de detecção**

No STA®, o método é linear até 160 % e o limite de detecção situa-se a 11 %.

- **Reprodutibilidade**

Foram efectuados estudos de reprodutibilidade em amostras normais e anormais. Os resultados obtidos no STA® estão reunidos no quadro a seguir:

	Reprodutibilidade intra-série		Reprodutibilidade inter-séries	
Amostra	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
n	21	21	10	10
$\bar{X}$ (%)	93	41	98	46
SD (%)	1,8	0,7	2,3	1,6
CV (%)	1,9	1,8	2,4	3,4

BIBLIOGRAFIA

1. REDDY K.N.N., MARKUS G.: "Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex". J. Biol. Chem., **247**, 1683-1691, 1972.
2. STEINBUCH M., FRIESS A., DROUET J., AMOUCH P.: "Absence of interaction between streptokinase/plasmin(ogen) complexes and α_2-macroglobulin (α_2M)" in "Proc. of the Vth Congress on Thrombosis and Haemostasis", Paris, Abst. 455, 1975.
3. SORIA J., SORIA C., SAMAMA M.: "Dosage du plasminogène à l'aide d'un substrat chromogène tripeptidique". Pathol. Biol., **24**, 725-729, 1976.
4. SORIA J., SORIA C., SAMAMA M.: "A plasminogen assay using a chromogenic synthetic substrate: results from clinical work and from studies of thrombolysis" in "Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis", 3, Davidson J.F., Rowan R.M., Samama M.M., Desnoyers P.C., New-York: Raven Press, 337-346, 1978.
5. MARTINOLI J.L., SVENDSEN L.: "Chromogenic substrates for plasmin and plasmin-like enzymes: a new generation" in "Proc. of the 6th International Congress on Fibrinolysis", Lausanne, Abst. 121, 1982.
6. SORIA J., SORIA C., BERTRAND O., DUNN F., SAMAMA M., BACHMANN F.: "The amidolytic activity of the SK-plasminogen complex is enhanced by a potentiator which is generated in the presence of vascular plasminogen activator - Role of fibrin degradation products". Thromb. Haemostasis, **47**, 3, 193-196, 1982.
7. SAMAMA M., CONARD J., HORELLOU M.H., LECOMPTE T.: "Physiologie et exploration de l'hémostase". Paris: Doin, 178-192, 1990.
8. DE MAISTRE E., WAHL D., LECOMPTE T., SAMAMA M.M.: "Déficit en plasminogène et thrombophilie". Sang Thromb. Vaiss., **7**, 493-498, 1995.
9. SAMPOL J., ARNOUX D., BOUTIERE B.: "Manuel d'hémostase". Paris: Editions scientifiques et médicales Elsevier, 57-59, 1995.

As mudanças significativas são indicadas por linhas pontilhadas na margem.

DIAGNOSTICA STAGO S.A.S.
3 allée Thérèse
92600 Asnières sur Seine (France)
+33 (0)1 46 88 20 20
webmaster@stago.com

As informações e/ou imagens contidas neste documento estão protegidas por copyright e outros direitos da propriedade intelectual, © 2015, Diagnostica Stago, todos os direitos reservados. Os logotipos e/ou os nomes dos produtos de Diagnostica Stago são marcas registadas.

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA CARLOS BORBOREMA

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO

Código POP	POP_IPCCB_LB_NNN_v01D_PT		
Título	Dosagem de fator tissular (FT)		
Idioma da versão original	PT		
Elaborado por: Sâmella Silva de Oliveira	**Revisado por:**	**Aprovado por:**	
Data e assinatura	**Data e assinatura**	**Data e assinatura**	**Data da próxima revisão:**

Histórico de revisões			
Nome	**Assinatura**	**Data (DD/MMM/AA)**	**Alterações realizadas**

1. OBJETIVOS

Descrever a determinação quantitativa da concentração de FT em plasma humano citratado utilizando o teste imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

2. DEFINIÇÕES

Fator tissular: é uma proteína transmembrana sintetizada em macrófagos e células endoteliais que se liga e ativa o fator VII da coagulação.

3. APLICÁVEL A

- Análise no laboratório de malária do IPCCB de amostras relacionadas à pesquisa;

4. RESPONSABILIDADES

- Equipe responsável pela análise das amostras relacionadas à pesquisa do IPCCB.

5. POP'S RELACIONADOS

POP’s sobre coleta e processamento de amostras de sangue.

6. PROCEDIMENTOS

A determinação quantitativa da concentração de FT em plasma humano citratado deverá ser realizada conforme instruções do fabricante (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Vide bula em anexo.

7. REFERÊNCIAS

- Colman RW, Clowes AW, Golhaber SZ, Marder VJ, George JN. Overview of hemostasis. In: Hemostasis an thrombosis: basic principles and clinical practice. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1–51.

8. ANEXOS

abcam®
discover more

ab108903 – Tissue Factor (CD142) Human ELISA Kit

Instructions for Use

For the quantitative measurement of Human Tissue Factor (CD142) in plasma, serum, tissue extracts and cell culture supernatants.

This product is for research use only and is not intended for diagnostic use.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

Table of Contents

INTRODUCTION

1. BACKGROUND 2
2. ASSAY SUMMARY 3

GENERAL INFORMATION

3. PRECAUTIONS 4
4. STORAGE AND STABILITY 4
5. MATERIALS SUPPLIED 4
6. MATERIALS REQUIRED, NOT SUPPLIED 5
7. LIMITATIONS 5
8. TECHNICAL HINTS 6

ASSAY PREPARATION

9. REAGENT PREPARATION 7
10. STANDARD PREPARATIONS 10
11. SAMPLE PREPARATION 13
12. PLATE PREPARATION 14

ASSAY PROCEDURE

13. ASSAY PROCEDURE 15

DATA ANALYSIS

14. CALCULATIONS 17
15. TYPICAL DATA 18
16. TYPICAL SAMPLE VALUES 19
17. ASSAY SPECIFICITY 20

RESOURCES

18. TROUBLESHOOTING 21
19. NOTES 23

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

INTRODUCTION

1. BACKGROUND

Abcam's Tissue Factor (CD142) Human *in vitro* ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kit is designed for the quantitative measurement of Tissue Factor concentrations in plasma, serum, tissue extracts, cell culture lysates and cell culture supernatants.

A Tissue Factor specific antibody has been precoated onto 96-well plates and blocked. Standards or test samples are added to the wells and subsequently a Tissue Factor specific biotinylated detection antibody is added and then followed by washing with wash buffer. Streptavidin-Peroxidase Conjugate is added and unbound conjugates are washed away with wash buffer. TMB is then used to visualize Streptavidin-Peroxidase enzymatic reaction. TMB is catalyzed by Streptavidin-Peroxidase to produce a blue color product that changes into yellow after adding acidic stop solution. The density of yellow coloration is directly proportional to the amount of Tissue Factor captured in plate.

The transmembrane protein Tissue Factor (TF) is the physiologic trigger of coagulation in normal hemostasis. TF binds and allosterically activates factor VII. The TF-VIIa complex cleaves factor IX and X, leading to thrombin generation. Inducible expression of TF in a variety of pathological conditions, including gram-negative sepsis and acute coronary syndromes, is associated with life-threatening thrombosis. In sepsis, TF expression within the vasculature leads to disseminated intravascular coagulation. TF also plays important roles in vasculogenesis, metastasis, and tumor-associated angiogenesis.

FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

2. ASSAY SUMMARY

Primary capture antibody

Prepare all reagents, samples and standards as instructed.

Sample

Add standard or sample to each well used. Incubate at room temperature.

Primary detector antibody

Wash and add prepared biotin antibody to each well. Incubate at room temperature.

Streptavidin Label

Wash and add prepared Streptavidin-Peroxidase Conjugate. Incubate at room temperature.

Substrate Colored product

Add Chromogen Substrate to each well. Incubate at room temperature. Add Stop Solution to each well. Read immediately.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

3. PRECAUTIONS

Please read these instructions carefully prior to beginning the assay.

Modifications to the kit components or procedures may result in loss of performance.

4. STORAGE AND STABILITY

Store kit at 4°C immediately upon receipt, apart from the SP Conjugate & Biotinylated Antibody, which should be stored at -20°C.

Refer to list of materials supplied for storage conditions of individual components. Observe the storage conditions for individual prepared components in sections 9 & 10.

5. MATERIALS SUPPLIED

Item	Amount	Storage Condition (Before Preparation)
Tissue Factor Microplate (12 x 8 well strips)	96 wells	4°C
Tissue Factor Standard	1 vial	4°C
10X Diluent N Concentrate	30 mL	4°C
Biotinylated Human Tissue Factor Antibody	1 vial	-20°C
100X Streptavidin-Peroxidase Conjugate (SP Conjugate)	80 µL	-20°C
Chromogen Substrate	8 mL	4°C
Stop Solution	12 mL	4°C
20X Wash Buffer Concentrate	2 x 30 mL	4°C
Sealing Tapes	3	N/A

FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

6. MATERIALS REQUIRED, NOT SUPPLIED

These materials are not included in the kit, but will be required to successfully utilize this assay:

- 1 Microplate reader capable of measuring absorbance at 450 nm.
- Precision pipettes to deliver 1 µL to 1 mL volumes.
- Adjustable 1-25 mL pipettes for reagent preparation.
- 100 mL and 1 liter graduated cylinders.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water.
- Log-log graph paper or computer and software for ELISA data analysis.
- 7 tubes to prepare standard or sample dilutions.

7. LIMITATIONS

- Do not mix or substitute reagents or materials from other kit lots or vendors.

FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

8. TECHNICAL HINTS

- Samples generating values higher than the highest standard should be further diluted in the appropriate sample dilution buffers.
- Avoid foaming or bubbles when mixing or reconstituting components.
- Avoid cross contamination of samples or reagents by changing tips between sample, standard and reagent additions.
- Ensure plates are properly sealed or covered during incubation steps.
- Complete removal of all solutions and buffers during wash steps.
- **This kit is sold based on number of tests. A 'test' simply refers to a single assay well. The number of wells that contain sample, control or standard will vary by product. Review the protocol completely to confirm this kit meets your requirements. Please contact our Technical Support staff with any questions.**

FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

9. REAGENT PREPARATION

Equilibrate all reagents to room temperature (18-25°C) prior to use. Prepare fresh reagents immediately prior to use. If crystals have formed in the concentrate, mix gently until the crystals have completely dissolved.

9.1 **1X Diluent N**

Dilute the 10X Diluent N Concentrate 1:10 with reagent grade water. Mix gently and thoroughly. *Store for up to 1 month at 4°C.*

9.2 **1X Wash Buffer**

Dilute the 20X Wash Buffer Concentrate 1:20 with reagent grade water. Mix gently and thoroughly.

9.3 **1X Biotinylated Tissue Factor Detector Antibody**

9.3.1 The stock Biotinylated Tissue Factor Antibody must be diluted with 1X Diluent N according to the label concentration to prepare 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody for use in the assay procedure. Observe the label for the "X" concentration on the vial of Biotinylated Tissue Factor Antibody.

9.3.2 Calculate the necessary amount of 1X Diluent N to dilute the Biotinylated Tissue Factor Antibody to prepare a 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody solution for use in the assay procedure according to how many wells you wish to use and the following calculation:

Number of Wells Strips	Number of Wells	(V_T) Total Volume of 1X Biotinylated Antibody (µL)
4	32	1,760
6	48	2,640
8	64	3,520
10	80	4,400
12	96	5,280

The undiluted antibody should be stored at -20°C.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

ASSAY PREPARATION

Where:

C_S = Starting concentration (X) of stock Biotinylated Tissue Factor Antibody (variable)

C_F = Final concentration (always = 1X) of 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody solution for the assay procedure

V_T = Total required volume of 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody solution for the assay procedure

V_A = Total volume of (X) stock Biotinylated Tissue Factor Antibody

V_D = Total volume of 1X Diluent N required to dilute (X) stock Biotinylated Tissue Factor Antibody to prepare 1X Biotinylated PAI1 solution for assay procedures

Calculate the volume of (X) stock Biotinylated Antibody required for the given number of desired wells:

$$(C_F / C_S) \times V_T = V_A$$

Calculate the final volume of 1X Diluent N required to prepare the 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody:

$$V_T - V_A = V_D$$

Example:

NOTE: This example is for demonstration purposes only. Please remember to check your antibody vial for the actual concentration of antibody provided.

C_S = 50X Biotinylated Tissue Factor Antibody stock

C_F = 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody solution for use in the assay procedure

V_T = 3,520 µL (8 well strips or 64 wells)

$$(1X/50X) \times 3{,}520\ \mu L = 70.4\ \mu L$$

$$3{,}520\ \mu L - 70.4\ \mu L = 3{,}449.6\ \mu L$$

V_A = 70.4 µL total volume of (X) stock Biotinylated Tissue Factor Antibody required

V_D = 3,449.6 µL total volume of 1X Diluent N required to dilute the 50X stock Biotinylated Antibody to prepare 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody solution for assay procedures

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

9.3.3 First spin the Biotinylated Tissue Factor Antibody vial to collect the contents at the bottom.

9.3.4 Add calculated amount V_A of stock Biotinylated Tissue Factor Antibody to the calculated amount V_D of 1X Diluent N. Mix gently and thoroughly.

9.4 **1X SP Conjugate**

Spin down the 100X Streptavidin-Peroxidase Conjugate (SP Conjugate) briefly and dilute the desired amount of the conjugate 1:100 with 1X Diluent N.

The undiluted conjugate should be stored at -20°C.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

10. STANDARD PREPARATIONS

- **Prepare serially diluted standards immediately prior to use. Always prepare a fresh set of standards for every use.**
- **Any remaining standard should be stored at -20°C after reconstitution and used within 10 days.**
- **This procedure prepares sufficient standard dilutions for duplicate wells.**

10.1 Reconstitution of the Tissue Factor Standard vial to prepare the 400 pg/mL Tissue Factor **Standard #1**:

10.1.1 First consult the Tissue Factor Standard vial to determine the mass of protein in the vial.

10.1.2 Calculate the appropriate volume of 1X Diluent N to add when resuspending the Tissue Factor Standard vial to produce a 400 pg/mL Tissue Factor **Standard #1** by using the following equation:

C_S = Starting mass of Tissue Factor Standard (see vial label) (pg)

C_F = 400 pg/mL Tissue Factor **Standard #1** final required concentration

V_D = Required volume of 1X Diluent N for reconstitution (µL)

Calculate total required volume 1X Diluent N for resuspension:

$$(C_S / C_F) \times 1{,}000 = V_D$$

Example:

NOTE: This example is for demonstration purposes only. Please remember to check your standard vial for the actual amount of standard provided.

C_S = 400 pg of Tissue Factor Standard in vial

C_F = 400 pg/mL Tissue Factor **Standard #1** final concentration

V_D = Required volume of 1X Diluent N for reconstitution

(400 pg / 400 pg/mL) x 1,000 = 1,000 µL

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

ASSAY PREPARATION

10.1.3 First briefly spin the Tissue Factor Standard Vial to collect the contents on the bottom of the tube.

10.1.4 Reconstitute the Tissue Factor Standard vial by adding the appropriate calculated amount V_D of 1X Diluent N to the vial to generate the 400 pg/mL Tissue Factor **Standard #1**. Mix gently and thoroughly.

10.2 Allow the reconstituted 400 pg/mL Tissue Factor **Standard #1** to sit for 10 minutes with gentle agitation prior to making subsequent dilutions

10.3 Label six tubes #2 – 7.

10.4 Add 120 µL of 1X Diluent N to tube #2 – 7.

10.5 To prepare **Standard #2**, add 120 µL of the **Standard #1** into tube #2 and mix gently.

10.6 To prepare **Standard #3**, add 120 µL of the **Standard #2** into tube #3 and mix gently.

10.7 Using the table below as a guide, prepare subsequent serial dilutions.

10.8 1X Diluent N serves as the zero standard, 0 pg/mL (tube #8).

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

ASSAY PREPARATION

Standard Dilution Preparation Table

Standard #	Volume to Dilute (µL)	Volume Diluent N (µL)	Total Volume (µL)	Starting Conc. (pg/mL)	Final Conc. (pg/mL)
1	Step 10.1				400.0
2	120	120	240	400.0	200.0
3	120	120	240	200.0	100.0
4	120	120	240	100.0	50.00
5	120	120	240	50.00	25.00
6	120	120	240	25.00	12.50
7	120	120	240	12.50	6.75
8	-	120	120	-	0

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

11. SAMPLE PREPARATION

11.1 Plasma

Collect plasma using one-tenth volume of 0.1 M sodium citrate as an anticoagulant. Centrifuge samples at 3,000 x *g* for 10 minutes. Dilute samples 1:2 into 1X Diluent N and assay. The undiluted samples can be stored at -20°C or below for up to 3 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles. (Heparin can also be used as anticoagulant).

11.2 Serum

Samples should be collected into a serum separator tube. After clot formation, centrifuge samples at 3000 x *g* for 10 minutes and. remove serum. Dilute samples 1:2 into 1X Diluent N, and assay. The undiluted samples can be stored at -20°C or below for up to 3 months. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

11.3 Tissue

Extract tissue samples with 50 mM Tris-buffered saline (pH7.4) containing 0.5% Triton X-100 and centrifuge at 14,000 x *g* for 30 min. Collect the supernatant, measure the protein concentration, and assay. The undiluted samples can be stored at -20°C or below.

11.4 Cell Culture Lysates

The cultured cells are lysed and solubilized with 15 mM octyl-β-D-glucopyranoside at 37°C for 15 minutes. Collect fresh cell lysates and assay. Samples can be stored at -80°C or below. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

11.5 Cell Culture Supernatant

Centrifuge cell culture media at 1500 rpm for 10 minutes at 4°C to remove debris and collect supernatant. Samples can be stored at -80°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

12. PLATE PREPARATION

- The 96 well plate strips included with this kit are supplied ready to use. It is not necessary to rinse the plate prior to adding reagents.
- Unused well plate strips should be returned to the plate packet and stored at 4°C.
- For statistical reasons, we recommend each sample should be assayed with a minimum of two replicates (duplicates).
- Well effects have not been observed with this assay. Contents of each well can be recorded on the template sheet included in the Resources section.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

13. ASSAY PROCEDURE

- **Equilibrate all materials and prepared reagents to room temperature (18 - 25°C) prior to use.**
- **It is recommended to assay all standards, controls and samples in duplicate.**

13.1 Prepare all reagents, working standards and samples as instructed. Equilibrate reagents to room temperature before use. The assay is performed at room temperature (18-25°C).

13.2 Remove excess microplate strips from the plate frame and return them immediately to the foil pouch with desiccant inside. Reseal the pouch securely to minimize exposure to water vapor and store in a vacuum desiccator.

13.3 Add 50 µL of Tissue Factor Standard or sample per well. Cover wells with a sealing tape and incubate for two hours. Start the timer after the last sample addition.

13.4 Wash five times with 200 µL of 1X Wash Buffer manually. Invert the plate each time and decant the contents; tap it 4-5 times on absorbent paper towel to completely remove the liquid. If using a machine wash six times with 300 µL of 1X Wash Buffer and then invert the plate, decant the contents; tap it 4-5 times on absorbent paper towel to completely remove the liquid.

13.5 Add 50 µL of 1X Biotinylated Tissue Factor Antibody to each well and incubate for two hours.

13.6 Wash microplate as described above.

13.7 Add 50 µL of 1X SP Conjugate to each well and incubate for 30 minutes. Turn on the microplate reader and set up the program in advance.

13.8 Wash microplate as described above.

13.9 Add 50 µL of Chromogen Substrate per well and incubate for about 10 minutes or till the optimal blue colour density

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

ASSAY PROCEDURE

develops. Gently tap plate to ensure thorough mixing and break the bubbles in the well with pipette tip.

13.10 Add 50 µL of Stop Solution to each well. The color will change from blue to yellow.

13.11 Read the absorbance on a microplate reader at a wavelength of 450 nm immediately. If wavelength correction is available, subtract readings at 570 nm from those at 450 nm to correct optical imperfections. Otherwise, read the plate at 450 nm only. Please note that some unstable black particles may be generated at high concentration points after stopping the reaction for about 10 minutes, which will reduce the readings.

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

14. CALCULATIONS

Calculate the mean value of the triplicate readings for each standard and sample. To generate a Standard Curve, plot the graph using the standard concentrations on the x-axis and the corresponding mean 450 nm absorbance on the y-axis. The best-fit line can be determined by regression analysis using log-log or four-parameter logistic curve-fit. Determine the unknown sample concentration from the Standard Curve and multiply the value by the dilution factor.

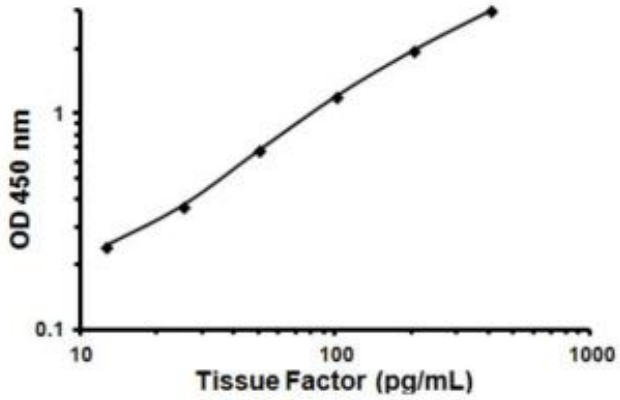
FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

DATA ANALYSIS

15. TYPICAL DATA

TYPICAL STANDARD CURVE – Data provided for demonstration purposes only. A new standard curve must be generated for each assay performed.



FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

DATA ANALYSIS

16. TYPICAL SAMPLE VALUES

SENSITIVITY –

The minimum detectable dose of Tissue Factor is typically ~4 pg/mL.

RECOVERY –

Standard Added Value: 25 – 200 pg/mL

Recovery %: 89 – 114.

Average Recovery %: 97

LINEARITY OF DILUTION –

Plasma Dilution	Average % Expected Value
No Dilution	95
1:2	98
1:4	104

Serum Dilution	Average % Expected Value
No Dilution	94
1:2	101
1:4	107

PRECISION –

	Intra-Assay	Inter-Assay
% CV	3.9	9.9

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD

INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

DATA ANALYSIS

17. ASSAY SPECIFICITY

Species	% Cross Reactivity
Canine	None
Monkey	None
Mouse	30
Rat	30
Swine	30
Bovine	None

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DOUTOR HEITOR VIEIRA DOURADO FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

18. TROUBLESHOOTING

Problem	Cause	Solution
Poor standard curve	Improper standard dilution	Confirm dilutions made correctly
	Standard improperly reconstituted (if applicable)	Briefly spin vial before opening; thoroughly resuspend powder (if applicable)
	Standard degraded	Store sample as recommended
	Curve doesn't fit scale	Try plotting using different scale
Low signal	Incubation time too short	Try overnight incubation at 4°C
	Target present below detection limits of assay	Decrease dilution factor; concentrate samples
	Precipitate can form in wells upon substrate addition when concentration of target is too high	Increase dilution factor of sample
	Using incompatible sample type (e.g. serum vs. cell extract)	Detection may be reduced or absent in untested sample types
	Sample prepared incorrectly	Ensure proper sample preparation/dilution
Large CV	Bubbles in wells	Ensure no bubbles present prior to reading plate
	All wells not washed equally/thoroughly	Check that all ports of plate washer are unobstructed wash wells as recommended
	Incomplete reagent mixing	Ensure all reagents/master mixes are mixed thoroughly
	Inconsistent pipetting	Use calibrated pipettes and ensure accurate pipetting
	Inconsistent sample preparation or storage	Ensure consistent sample preparation and optimal sample storage conditions (eg. minimize freeze/thaws cycles)

FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

RESOURCES

Problem	Cause	Solution
High background/ Low sensitivity	Wells are insufficiently washed	Wash wells as per protocol recommendations
	Contaminated wash buffer	Make fresh wash buffer
	Waiting too long to read plate after adding STOP solution	Read plate immediately after adding STOP solution
	Improper storage of ELISA kit	Store all reagents as recommended. Please note all reagents may not have identical storage requirements.
	Using incompatible sample type (e.g. Serum vs. cell extract)	Detection may be reduced or absent in untested sample types

FMT-HVD
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA Carlos Borborema

7.2. Instrumentos de coleta de dados

Formulário para Coleta de Dados dos Prontuários do Sistema *Idoctor*

Fundação de Medicina Tropical
Doutor Heitor Vieira Dourado / FMT-HVD

FICHA DE ACIDENTES OFÍDICOS / FMT-HVD

Dados Demográficos

1-Código do paciente: 2-Prontuário

3-Idade: / / 4-Sexo: ☐ 5-Zona da residência: ☐

6-Profissão: 7-Data do acidente: / / 8-Hora do acidente:

9-Município de ocorrência: 10-Zona da ocorrência: ☐

11-Hora da admissão hospitalar: 12-Data da admissão hospitalar: / /

Dados Epidemiológicos

13-Tipo de serpente: ☐

14-Acidente de trabalho: ☐ 15-Tempo para o atendimento médico:

16-Local da picada ☐ 17-Trouxe o animal ☐

18-Viu o animal ☐ 19-Espécie identificada ☐

20-Acidentes anteriores ☐ 21-Quantos:_____ 22-Tempo de internação:_____

23-Desfecho ☐ 24-Motivo do óbito ☐

Dados Clínicos Admissão

0 = Não /1 = Sim /9 = Ignorado 25-Edema ☐ 26-Extensão do edema ☐ 27-Dor ☐

28-Sangramento local ☐ 29-Flictema ☐ 30-Eritema ☐ 31-Hematoma local ☐

32-Marca da presa ☐ 33-Equimose local ☐ 34-Náuseas ☐ 35-Vômitos ☐

36-Cefaléia ☐ 37-Man. Hemorrágica sistêmica ☐ 38-Gengivorragia ☐ 39-Hematêmese ☐

40-Epistaxe ☐ 41-Hemoptise ☐ 42-Hemorragia conjuntival ☐ 43-Enterorragia ☐

44-Hipermenorragia ☐ 45-Equimose em outras partes do corpo ☐ 46-Petéquias ☐

47-Macro hematúria ☐ 48-Outras manifestações:

Dados Laboratoriais Admissão

49-Creatinina: 50-Uréia: 51-Potássio: 52-Sódio:

53-Plaquetas: 54-MPV: 55-TC: 56-TP:

57-AP: 58-INR: 59-Leucócitos 60-Hematócrito:

61-Hemoglobina: 62-TGO: 63-TGP: 64-DHL:

65-Observações:

Dados Clínicos 24 horas

0 = Não /1 = Sim /9 = Ignorado 66-Edema ☐ 67-Extensão do edema ☐ 68-Dor ☐

69-Sangramento local ☐ 70-Flictema ☐ 71-Eritema ☐ 72-Hematoma local ☐

73-Marca da presa ☐ 74-Equimose local ☐ 75-Náuseas ☐ 76-Vômitos ☐

77-Cefaléia ☐ 78-Man. Hemorrágica sistêmica ☐ 79-Gengivorragia ☐ 80-Hematêmese ☐

81-Epistaxe ☐ 82-Hemoptise ☐ 83-Hemorragia conjuntival ☐ 84-Enterorragia ☐

85-Hipermenorragia ☐ 86-Equimose em outras partes do corpo ☐ 87-Petéquias ☐

88-Macro hematúria ☐ 89-Outras manifestações:

Dados Laboratoriais 24 horas

90-Creatinina: 91-Uréia: 92-Potássio: 93-Sódio:

94-Plaquetas: 95-MPV: 96-TC: 97-TP:

98-AP: 99-INR: 100-Leucócitos 101-Hematócrito:

102-Hemoglobina: 103-TGO: 104-TGP: 105-DHL:

106-Observações:

Dados Clínicos 48 horas

0 = Não /1 = Sim /9 = Ignorado 107-Edema ☐ 108-Extensão do edema ☐ 109-Dor ☐

110-Sangramento local ☐ 111-Flictema ☐ 112-Eritema ☐ 113-Hematoma local ☐

114-Marca da presa ☐ 115-Equimose local ☐ 116-Náuseas ☐ 117-Vômitos ☐

118-Cefaléia ☐ 119-Man. Hemorrágica sistêmica ☐ 120-Gengivorragia ☐ 121-Hematêmese ☐

122-Epistaxe ☐ 124-Hemoptise ☐ 125-Hemorragia conjuntival ☐ 126-Enterorragia ☐

126-Hipermenorragia ☐ 127-Equimose em outras partes do corpo ☐ 128-Petéquias ☐

129-Macro hematúria ☐ 130-Outras manifestações:

Dados Laboratoriais 48 horas

131-Creatinina: 132-Uréia: 133-Potássio: 134-Sódio:

135-Plaquetas: 136-MPV: 137-TC: 138-TP:

139-AP: 140-INR: 141-Leucócitos 142-Hematócrito:

143-Hemoglobina: 144-TGO: 145-TGP: 146-DHL:

147-Observações:

Dados Clínicos Alta Hospitalar

0 = Não /1 = Sim /9 = Ignorado 148-Edema ☐ 149-Extensão do edema ☐ 150-Dor ☐

151-Sangramento local ☐ 152-Flictema ☐ 153-Eritema ☐ 154-Hematoma local ☐

155-Marca da presa ☐ 156-Equimose local ☐ 157-Náuseas ☐ 158-Vômitos ☐

159-Cefaléia ☐ 160-Man. Hemorrágica sistêmica ☐ 161-Gengivorragia ☐ 162-Hematêmese ☐

162-Epistaxe ☐ 164-Hemoptise ☐ 165-Hemorragia conjuntival ☐ 166-Enterorragia ☐

167-Hipermenorragia ☐ 168-Equimose em outras partes do corpo ☐ 169-Petéquias ☐

170-Macro hematúria ☐ 171-Outras manifestações:

Dados Laboratoriais Alta Hospitalar

172-Creatinina: 173-Uréia: 174-Potássio: 175-Sódio:

176-Plaquetas: 177-MPV: 178-TC: 179-TP:

180-AP: 181-INR: 182-Leucócitos 183-Hematócrito:

184-Hemoglobina: 185-TGO: 186-TGP: 187-DHL:

188-Observações:

Formulário para Coleta de Dados dos Pacientes

DISTÚRBIOS HEMOSTÁTICOS EM ACIDENTES BOTRÓPICOS E LAQUÉTICOS NA REGIÃO DE MANAUS, ESTADO DO AMAZONAS

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Sâmella Silva de Oliveira (92) 98204 5999
Wuelton Marcelo Monteiro

EQUIPE DE TRABALHO: Iran Mendonça da Silva (92) 99322 3775
Jacqueline Sachett (92) 98151 8086
Eliane Campos Alves (92) 98199 7110

Prontuário: _____

Nome: _____

Código do Estudo: _____

CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO:

1. Uso de soro antiofídico em outra unidade de saúde: ◯ SIM ◯ NÃO

2. Falta de vontade ou incapacidade de assinar o consentimento informado (paciente e ou pais / responsável legal): ◯ SIM ◯ NÃO

1. Dados do Paciente

Contato telefônico: ( ) _____ ( ) _____

Endereço: _____ nº _____ Bairro: _____

Município: _____

Sexo: ☐ 1-Masculino 2-Feminino **Profissão**: _____

Data de nascimento ____/____/____ Idade: ☐☐

2. Dados do acidente ofídico

2.1 Procedência: ☐ 1-Manaus 2-Interior. Qual? _____

2.2 Data do acidente: ____/____/____ **2.3** Hora Aproximada do Acidente: ____:____

2.4 Data da internação na FMT-HVD: ____/___/____ **2.5** Hora da admissão: ____:____

2.6 Data da saída na FMT-HVD: ____/____/____

2.7 Motivo: ☐ 1-Alta 2-Óbito 3-Transferência

2.8 Zona de Ocorrência: ☐ 1-Rural 2-Urbana 3-Periurbana 9-Ignorado

2.9 Local da picada: ☐ 1-Cabeça 2-Braço 3-Perna 4-Tronco 5-Pescoço 6-Mão 7-Coxa 8-Antebraço 9-Pé 10-Outro (Espec.): _____

2.10 Lado do corpo afetado: ☐ 1-Direito 2-Esquerdo 3-Central

2.11 Andou ou caminhou após acidente: ☐ 1-Não 2-Sim. Quanto tempo? ____ min.

2.12 Acidente relacionado ao trabalho: ☐ 1-Não 2-Sim

2.13. Circunstâncias do acidente: _____

Viu o animal? _____ Nome atribuído ao animal: _____

2.14. Houve acidente anterior: ☐ 1-Não 2-Sim. Quantos? _____

Data do último: ____/_____ (mês/ano)

3. Soroterapia – Classificação do Acidente ofídico

3.1 Tipo do acidente: ☐ 1-Botrópico 2-Laquético 3-Não identificado

3.2 Classificação do acidente: 1-Leve 2-Moderado 3-Grave

Classificação do Acidente e Soroterapia (Ver quadro a seguir): (*antes de iniciar soroterapia coletar sangue).

Botrópico

Leve: quadro local discreto (edema local de até 2 segmentos), sangramento em pele ou mucosas; pode haver apenas distúrbio na coagulação.	**Antiveneno**: botrópico (SAB) **2 a 4 ampolas**
Moderado: edema (edema local de 3 a 4 segmentos) e equimose evidentes, sangramento sem comprometimento do estado geral; pode haver distúrbio na coagulação.	**Antiveneno**: botrópico (SAB) **5 a 8 ampolas**
Grave: alterações locais intensas (edema local de 5 segmentos), hemorragia grave, hipotensão, anúria.	**Antiveneno**: botrópico (SAB). **12 ampolas**

Laquético

Moderado: quadro local presente (Idem botrópico), pode haver sangramentos, manifestações vagais leves (PA>80x40 mmHg e pulso acima de 50 bpm).	**Antiveneno** botrópico-laquético (SABL) **10 ampolas**
Grave: quadro local intenso (Idem botrópico), hemorragia intensa, com manifestações vagais (PA<80x40 mmHg e Pulso abaixo de 50 bpm).	**Antiveneno:** botrópico-laquético (SABL) **20 ampolas**

3.3 Número de ampolas administradas: _____ Hora da Soroterapia: _____:_____

Obs:

_____

_

3.4 Reação Adversa à Soroterapia (até 24 horas após infusão): ☐ 1-Não 2-Sim

☐ taquicardia ☐ taquipneia ☐ dispneia ☐ urticária ☐ náuseas

☐ vômitos ☐ hipotensão ☐ prurido ☐ choque ☐ broncoespasmo

☐ rouquidão e estridor laríngeo ☐ reação anafilática

☐ outra:_____

3.5 Hora da Reação Adversa: _____:_____

4. Histórico:

4.1 Houve medicamentos orais/injetáveis anteriores a internação:

☐ 1-Não 2-Sim (Espec.):_____

4.2 Houve uso de produtos no local do acidente:

☐ 1-Não 2-Sim (Espec.): _____

4.3 Condutas adotadas após o acidente: ☐ 1-Não 2-Sim

☐ Torniquete/garrote ☐ Sucção Labial ☐ Outro: _____

T0 – ADMISSÃO DO PACIENTE

5. Dados clínicos do paciente

5.1 Data da avaliação: ____/____/_____ **5.2 Hora**: ____:____

5.3 Pressão arterial: _____X_____ mm Hg **5.4 Pulso** _____ por min

5.5.Temp. _____ºC **5.6 Freq. Resp.** _____ rpm

5.8 Doenças, Tratamentos ou Queixas concomitantes (comorbidades): ☐ 1-Não 2-Sim

☐ Doenças Hematológicas ☐ Uso de anticoncepcional

☐ Uso de anticoagulante ☐ Outro: _____

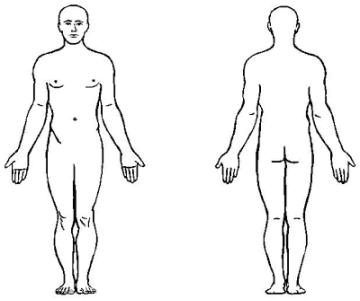
5.9 Manifestações Locais: ☐ 1-Não 2-Sim

5.9.1 Sangramento

☐ Sangramento no local da picada

☐ Equimose local evidente

5.9.2 Edema



☐ Leve - edema local de até 2 segmentos

☐ Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

☐ Grave - edema local de 5 segmentos

Circunferência da região acometida (cm):

Lado direito: _____ cm Lado esquerdo: _____ cm região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm

*marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P o local da picada)

5.9.3 Linfonodos: ☐ 1-Não 2-Sim Características: _____

5.9.4 Dor - classificação numérica na escala de 0 - 10 (Antes do uso de analgésico):

Valor: ☐ Ausente: 0; ☐ Leve: 1-3; ☐ Moderado: 4-7; ☐ Grave: 8-10

☐ Espontânea ☐ Ao toque ☐ Ao movimento

5.9.5. Tonalidade perilesional:

☐ Normal ☐ violácea ☐ vermelhidão ☐ necrótica

5.9.6 Características da Pele: 1-Não 2-Sim

☐ equimose ☐ bolhas ☐ secreção serosa ☐ somente a marca da presa

5.9.7.Temperatura: área acometida _____ ºC área contralateral _____ºC

5.10 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X:

☐ Anúria ☐ Cefaleia ☐ Choque ☐ Cólicas abdominais ☐ Convulsão

☐ Diarreia ☐ Enterorragia (melena e hematoquesia) ☐ Epistaxe

☐ Equimose ☐ Gengivorragia ☐ Hematêmese ☐ Hematúria ☐ Petéquias

☐ Hemoptise ☐ Hemorragia conjuntival ☐ Hipermenorragia ☐ Náuseas

☐ Oligúria ☐ Otorragia ☐ Sudorese ☐ Vômito

☐ Outras:_____

5.11. Complicações locais e sistêmicas:

5.11.1. Infecção Secundária: ☐ 1-Não 2-Sim

Manifestações locais: ☐ Celulite ☐ Abscesso ☐ outro: _____

5.11.2. Síndrome Compartimental: ☐ 1-Não 2- Sim

5.11.3. Insuficiência Renal Aguda: ☐ 1-Não 2-Sim

5.11.4. Outros: _____

Tratamento instituído: _____

6. Dados da Serpente

6.1 Trouxe a serpente: ☐ 1-Não 2-Sim

INFORMAÇÕES ABAIXO SERÃO INFORMADAS PELA GERÊNCIA DE ANIMAIS PEÇONHENTOS

6.2 Serpente envolvida: ☐ 1-*Bothrops* 2-*Lachesis* 9-Ignorado

3-Outro (Espec.): _____

6.3 Sexo da serpente: ☐ 1-Masculino 2-Feminino

6.4 Estágio ontogenético: _____ 6.5 Tamanho da serpente: _____cm

Tempo de coagulação: _____

Avaliador: _____

T12 – 12 HORAS APÓS O AV

7. Dados clínicos do paciente

7.1 Data da avaliação: ____/____/_____ **7.2 Hora**: ____:____

7.3 Pressão arterial: _____X_____ mm Hg **7.4 Pulso** _____ por min

7.5Temp. _____ºC **7.6 Freq. Resp.** _____ rpm

QUEIXAS: _____

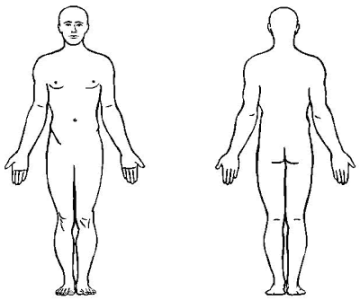
7.7. Manifestações Locais: ☐ 1-Não 2-Sim

7.7.1 Sangramento

☐ Sangramento no local da picada

☐ Equimose local evidente

7.7.2 Edema



☐ Leve - edema local de até 2 segmentos

☐ Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

☐ Grave - edema local de 5 segmentos

Circunferência da região acometida (cm):

Lado direito: _____ cm Lado esquerdo: _____ cm região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm

*marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P o local da picada)

7.7.3 Linfonodos: ☐ 1-Não 2-Sim Características: _____

7.7.4 Dor - classificação numérica na escala de 0 - 10 (Após o uso de analgésico):

Valor: ☐ Ausente: 0; ☐ Leve: 1-3; ☐ Moderado: 4-7; ☐ Grave: 8-10

☐ Espontânea ☐ Ao toque ☐ Ao movimento

7.7.5. Tonalidade perilesional:

☐ Normal ☐ violácea ☐ vermelhidão ☐ necrótica

7.7.6 Características da Pele: 1-Não 2-Sim

☐ equimose ☐ bolhas ☐ secreção serosa ☐ somente a marca da presa

7.7.7.Temperatura: área acometida _____ ºC área contralateral _____ºC

7.8 Manifestações Sistêmicas: ☐ 1-Não 2-Sim, marcar um X:

☐ Anúria ☐ Cefaleia ☐ Choque ☐ Cólicas abdominais ☐ Convulsão

☐ Diarreia ☐ Enterorragia (melena e hematoquesia) ☐ Epistaxe

☐ Equimose ☐ Gengivorragia ☐ Hematêmese ☐ Hematúria ☐ Petéquias

☐ Hemoptise ☐ Hemorragia conjuntival ☐ Hipermenorragia ☐ Náuseas

☐ Oligúria ☐ Otorragia ☐ Diarreia ☐ Sudorese ☐ Vômito

☐ Outras:_____

7.9. Complicações locais e sistêmicas:

7.9.1. Infecção Secundária: ☐ 1-Não 2-Sim

Manifestações locais: ☐ Celulite ☐ Abscesso ☐ outro: _____

7.9.2. Síndrome Compartimental: ☐ 1-Não 2-Sim

7.9.3. Insuficiência Renal Aguda: ☐ 1-Não 2-Sim

7.9.4. Outros: _____

Tratamento instituído: _____

Tempo de coagulação: _____

Avaliador: _____

T24 – 24 HORAS APÓS O AV

8. Dados clínicos do paciente

8.1 Data da avaliação: ____/____/_____ **8.2 Hora**: ____:____

8.3 Pressão arterial: _____X_____ mm Hg **8.4 Pulso** _____ por min

8.5.Temp. _____ºC **8.6 Freq. Resp.** _____ rpm

QUEIXAS: _____

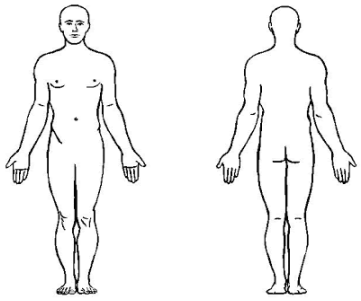
8.7 Manifestações Locais: ☐ 1-Não 2-Sim

8.7.1 Sangramento

☐ Sangramento no local da picada

☐ Equimose local evidente

8.7.2 Edema



☐ Leve - edema local de até 2 segmentos

☐ Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

☐ Grave - edema local de 5 segmentos

Circunferência da região acometida (cm):

Lado direito: _____ cm Lado esquerdo: _____ cm região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm

*marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P o local da picada)

8.7.3 Linfonodos: ☐ 1-Não 2-Sim Características: _____

8.7.4 Dor - classificação numérica na escala de 0 - 10 (Após o uso de analgésico):

Valor: ☐ Ausente: 0; ☐ Leve: 1-3; ☐ Moderado: 4-7; ☐ Grave: 8-10

☐ Espontânea ☐ Ao toque ☐ Ao movimento

8.7.5. Tonalidade perilesional:

☐ Normal ☐ violácea ☐ vermelhidão ☐ necrótica

8.7.6 Características da Pele: 1-Não 2-Sim

☐ equimose ☐ bolhas ☐ secreção serosa ☐ somente a marca da presa

8.7.7.Temperatura: área acometida _____ ºC área contralateral _____ºC

8.9 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X:

☐ Anúria ☐ Cefaleia ☐ Choque ☐ Cólicas abdominais ☐ Convulsão

☐ Diarreia ☐ Enterorragia (melena e hematoquesia) ☐ Epistaxe

☐ Equimose ☐ Gengivorragia ☐ Hematêmese ☐ Hematúria ☐ Petéquias

☐ Hemoptise ☐ Hemorragia conjuntival ☐ Hipermenorragia ☐ Náuseas

☐ Oligúria ☐ Otorragia ☐ Diarreia ☐ Sudorese ☐ Vômito

☐ Outras:_____

8.10 Complicações locais e sistêmicas:

8.10.1. Infecção Secundária: ☐ 1-Sim 2-Não

Manifestações locais: ☐ Celulite ☐ Abscesso ☐ outro: _____

8.10.2. Síndrome Compartimental: ☐ 1-Sim 2-Não

8.10.3. Insuficiência Renal Aguda: ☐ 1-Sim 2-Não

8.10.4. Outros: _____

Tratamento instituído: _____

Tempo de coagulação: _____

Avaliador: _____

T48 – 48 HORAS APÓS O AV

9. Dados clínicos do paciente

9.1 Data da avaliação: ____/____/_____ **9.2 Hora**: ____:____

9.3 Pressão arterial: _____X_____ mm Hg **9.4 Pulso** _____ por min

9.5.Temp. _____ºC **9.6 Freq. Resp.** _____ rpm

QUEIXAS: _____

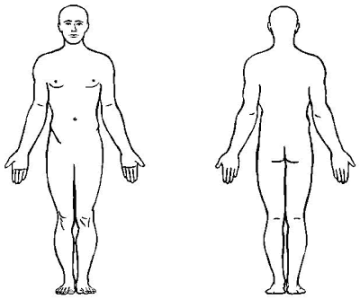
9.7. Manifestações Locais: ☐ 1-Não 2-Sim

9.7.1 Sangramento

☐ Sangramento no local da picada

☐ Equimose local evidente

9.7.2 Edema



☐ Leve - edema local de até 2 segmentos

☐ Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

☐ Grave - edema local de 5 segmentos

Circunferência da região acometida (cm):

Lado direito: _____ cm Lado esquerdo: _____ cm região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm

*marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P o local da picada)

9.7.3 Linfonodos: ☐ 1-Não 2-Sim Características: _____

9.7.4 Dor - classificação numérica na escala de 0 - 10 (Após o uso de analgésico):

Valor: ☐ Ausente: 0; ☐ Leve: 1-3; ☐ Moderado: 4-7; ☐ Grave: 8-10

☐ Espontânea ☐ Ao toque ☐ Ao movimento

9.7.5. Tonalidade perilesional:

☐ Normal ☐ violácea ☐ vermelhidão ☐ necrótica

9.7.6 Características da Pele: 1-Não 2-Sim

☐ equimose ☐ bolhas ☐ secreção serosa ☐ somente a marca da presa

9.7.7.Temperatura: área acometida _____ ºC área contralateral _____ºC

9.7.8 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X:

☐ Anúria ☐ Cefaleia ☐ Choque ☐ Cólicas abdominais ☐ Convulsão

☐ Diarreia ☐ Enterorragia (melena e hematoquesia) ☐ Epistaxe

☐ Equimose ☐ Gengivorragia ☐ Hematêmese ☐ Hematúria ☐ Petéquias

☐ Hemoptise ☐ Hemorragia conjuntival ☐ Hipermenorragia ☐ Náuseas

☐ Oligúria ☐ Otorragia ☐ Diarreia ☐ Sudorese ☐ Vômito

☐ Outras:_____

9.8. Complicações locais e sistêmicas:

9.8.1. Infecção Secundária ☐ 1-Não 2-Sim

Manifestações locais: ☐ Celulite ☐ Abscesso ☐ outro: _____

9.8.2. Síndrome Compartimental: ☐ 1-Não 2-Sim

9.8.3. Insuficiência Renal Aguda: ☐ 1-Não 2-Sim

9.8.4. Outros: _____

Tratamento instituído: _____

Tempo de coagulação: _____

Avaliador: _____

Talta – Alta do paciente

10. Dados clínicos do paciente

10.1 Data da avaliação: ____/____/_____ **10.2 Hora**: ____:____

10.3 Pressão arterial: _____X_____ mm Hg **10.4 Pulso** _____ por min

10.5.Temp. _____ºC **10.6 Freq. Resp.** _____ rpm

QUEIXAS: _____

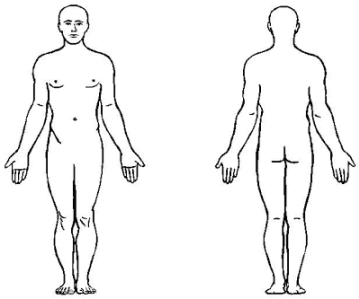
10.7. Manifestações Locais: ☐ 1-Não 2-Sim

10.7.1 Sangramento

☐ Sangramento no local da picada

☐ Equimose local evidente

10.7.2 Edema



☐ Leve - edema local de até 2 segmentos

☐ Moderado - edema local de 3 a 4 segmentos

☐ Grave - edema local de 5 segmentos

Circunferência da região acometida (cm):

Lado direito: _____ cm Lado esquerdo: _____ cm região ímpar: _____ cm

Extensão do edema: _____ cm

*marcar na figura o edema tanto no sentido distal quanto proximal do local da picada (marcar com P o local da picada)

10.7.3 Linfonodos: ☐ 1-Não 2-Sim Características: _____

10.7.4 Dor - classificação numérica na escala de 0 - 10 (Após o uso de analgésico):

Valor: ☐ Ausente: 0; ☐ Leve: 1-3; ☐ Moderado: 4-7; ☐ Grave: 8-10

☐ Espontânea ☐ Ao toque ☐ Ao movimento

10.7.5. Tonalidade perilesional:

☐ Normal ☐ violácea ☐ vermelhidão ☐ necrótica

10.7.6 Características da Pele: 1-Não 2-Sim

☐ equimose ☐ bolhas ☐ secreção serosa ☐ somente a marca da presa

10.7.7.Temperatura: área acometida _____ ºC área contralateral _____ºC

10.8 Manifestações Sistêmicas: 1-Não 2-Sim, marcar um X:

☐ Anúria ☐ Cefaleia ☐ Choque ☐ Cólicas abdominais ☐ Convulsão

☐ Diarreia ☐ Enterorragia (melena e hematoquesia) ☐ Epistaxe

☐ Equimose ☐ Gengivorragia ☐ Hematêmese ☐ Hematúria ☐ Petéquias

☐ Hemoptise ☐ Hemorragia conjuntival ☐ Hipermenorragia ☐ Náuseas

☐ Oligúria ☐ Otorragia ☐ Diarreia ☐ Sudorese ☐ Vômito

☐ Outras:_____

10.9. Complicações locais e sistêmicas:

10.9.1. Infecção Secundária: ☐ 1-Não 2-Sim

Manifestações locais: ☐ Celulite ☐ Abscesso ☐ outro: _____

10.9.2. Síndrome Compartimental: ☐ 1-Não 2-Sim

10.9.3. Insuficiência Renal Aguda: ☐ 1-Não 2-Sim

10.9.4. Outros: _____

Tratamento instituído: _____

Tempo de coagulação: _____

Avaliador: _____

7.3. Parecer ético

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO ((FMT-HVD))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS ACIDENTES OFÍDICOS ATENDIDOS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM DOENÇAS TROPICAIS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA

Pesquisador: Sâmella Silva de Oliveira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53192516.8.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.433.431

Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa intitulado " CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, LABORATORIAIS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS ACIDENTES OFÍDICOS ATENDIDOS EM UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA EM DOENÇAS TROPICAIS NA AMAZÔNIA BRASILEIRA", de responsabilidade da pesquisadora: Sâmella Silva de Oliveira.CAAE: 53192516.8.0000.0005

Os acidentes ofídicos são um importante problema de Saúde Pública no Brasil, acometendo principalmente trabalhadores da zona rural, do sexo masculino e na faixa etária entre 20-59 anos. As serpentes do gênero Bothrops causam a maioria desses acidentes, seguido das serpentes dos gêneros Crotalus, Lachesis e Micrurus. Na Amazônia brasileira, os adultos do sexo masculino que trabalham na zona rural também são as principais vítimas dos acidentes ofídicos. As serpentes Bothrops são as principais responsáveis pelos acidentes na região, seguido por serpentes Lachesis, Crotalus e Micrurus. Os vítimas de acidentes ofídicos apresentam diferentes sintomatologias locais e sistêmicas a depender do tipo de serpente causadora do acidente. O tratamento desses acidentes baseia-se na administração de antivenenos específicos para cada tipo de envenenamento.

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25
Bairro: D. Pedro I **CEP:** 69.040-000
UF: AM **Município:** MANAUS
Telefone: (92)2127-3572 **Fax:** (92)2127-3572 **E-mail:** cep@fmt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA DOURADO ((FMT-HVD))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Distúrbios hemostáticos em acidentes botrópicos e laquéticos na região de Manaus, estado do Amazonas.

Pesquisador: Sâmella Silva de Oliveira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 49671815.5.0000.0005

Instituição Proponente: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.302.174

Apresentação do Projeto:

A maioria dos acidentes ofídicos na Amazônia brasileira é causada por serpentes Bothrops atrox. Os acidentes botrópicos caracterizam-se por manifestações clínicas locais (edema, dor e equimose) e sistêmicas (alterações da coagulação e sangramentos). A serpente Lachesis muta, coabitante na região Amazônica, ocasiona acidentes com sintomatologia semelhante à dos acidentes botrópicos, o que dificulta o diagnóstico clínico diferencial desses acidentes na região. Contudo, o imunodiagnóstico ainda não é rotina nos serviços de saúde e poucos pacientes levam a serpente causadora do acidente para identificação. O tratamento específico do acidente botrópico consiste na administração dos antivenenos botrópico, botrópico-laquético ou botrópico-crotálico. No entanto, o veneno de B. atrox não faz parte do pool de imunização utilizado na produção desses antivenenos. Estudos demonstram que o veneno de B. atrox possui componentes com atividades procoagulante e trombina-símile, o que leva a um consumo dos fatores de coagulação resultando em incoagulabilidade sanguínea nas vítimas desses acidentes. Os componentes que induzem ou inibem a agregação plaquetária foram também isolados do veneno de B. atrox. Sabe-se que a composição e as atividades biológicas dos venenos de serpentes podem variar de maneira inter ou intraespecífica, a depender da origem geográfica, sexo ou estágio ontogenético das serpentes.

7.4. Produção Científica em estudos complementares durante o curso de doutorado

7.4.1. Artigos completos publicados ou aceitos para publicação

CLINICAL TOXICOLOGY
https://doi.org/10.1080/15563650.2018.1560463

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

SHORT COMMUNICATION

Low accuracy of microscopic hematuria in detecting coagulopathy from *Bothrops* pit viper bites, Brazilian Amazon

Jose Diego de Brito Sousa[a,b], Sâmella Silva de Oliveira[a,b], Jacqueline Sachett[a,b,c], Hui Wen Fan[d] and Wuelton Marcelo Monteiro[a,b]

[a]Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundacão de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil; [b]Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil; [c]Fundação Alfredo da Matta, Manaus, Brazil; [d]Instituto Butantan, Divisão de Desenvolvimento Tecnológico e Produção, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Introduction: The common lancehead snakes (*Bothrops atrox)* are responsible for up to 90% of snakebites in the Amazon, especially in remote areas. The prevalence of microhematuria is similar to that of coagulopathy in *B. atrox* envenomation in the Amazon. Thus, this study aimed to assess the reliability of microhematuria as an inexpensive and simple alternative to detect snake-induced consumption coagulopathy.

Methods: We analyzed samples from patients with confirmed *B. atrox* envenomation in terms of plasma fibrinogen and microhematuria (>3 red blood cells per high power field) in order to access the reliability of microhematuria to detect snakebite-induced coagulopathy, within 12 hours from admission.

Results: A total of 186 patients were recruited. From the total, 85.5% of patients had hypofibrinogenemia and only about 50% ($n = 94$) had a microscopic examination of urine within 12 hours where microhematuria was present in 39 (41.5%). Diagnostic performance showed 38.6% sensitivity and 36.4% specificity (cutpoint 200 mg/dL). No clear association was seen between microhematuria and hypofibrinogenemia (r: −0.10; p: .34).

Conclusion: In this study, microhematuria presented poor diagnostic performance to detect coagulopathy. Further studies are necessary to screen inexpensive and simple alternative diagnostic tools.

ARTICLE HISTORY
Received 4 November 2018
Revised 26 November 2018
Accepted 11 December 2018
Published online 25 January 2019

KEYWORDS
Microhematuria; snakebite; coagulopathy; sensitivity

Introduction

The common lancehead snakes, especially *Bothrops atrox* species, are responsible for up to 90% of snakebites in the Amazon, mostly in remote areas [1]. Venom-induced coagulopathy is a major systemic effect from *Bothrops* bites, affecting on average 80% of the patients in the Brazilian Amazon [2]. This condition results from thrombin-like components of the venom, which directly hydrolyzes fibrinogen to fibrin, and procoagulant activity, which activates factors II and X of the coagulation, resulting in the formation of endogenous thrombin [3].

Bedside whole-blood clotting tests, such as the 20-minute whole-blood clotting test (WBCT20) [4] and the Lee-White clotting time (LWCT) [2], have been used as inexpensive methods to detect venom-induced coagulopathy. However, their reliability in the clinical routine is still a matter of debate due to difficulties of interpretation and interval to result. There is an unmet need for simple diagnostic tests that can accurately and promptly diagnose venom-induced coagulopathy. A recent study has shown microscopic hematuria in 60% of the *Bothrops* snakebites in the Amazon [5]. Since this estimate is similar to venom-induced coagulopathy frequency, the present study aimed to analyze the accuracy of the microscopic hematuria in detecting coagulopathy from *Bothrops* envenomation in the Brazilian Amazon.

Methods

We enrolled patients with confirmed *Bothrops* envenomation in a clinical trial at a tertiary health unit in Manaus, Brazil [6]. Plasma and urine samples were collected before antivenom administration and blindly analyzed. Fibrinogen measurements were performed according to Brito-Sousa et al. [2]. We defined microhematuria as the presence of >3 red blood cells per high-power field (RBCs/hpf) under light microscopy [7] within 12 hours from admission, before antivenom administration. We calculated the diagnostic performance of microhematuria against the gold standard (fibrinogenemia) with 95% confidence intervals using Stata v14 (College Station, TX). We calculated the correlation between urine red blood cell concentrations and fibrinogen concentrations using Pearson's correlation. This study was approved by the Institutional Ethics Review Board (approval number 492.892/2013). All patients provided written and informed consent to participate in the study.

CONTACT Wuelton Marcelo Monteiro wueltonmm@gmail.com Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil
© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon

Eliane Campos Alves[1,2☯], Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett[1,2☯*], Vanderson Souza Sampaio[1,2,3], José Diego de Brito Sousa[1,2], Sâmella Silva de Oliveira[1,2], Elizandra Freitas do Nascimento[2], Alessandra dos Santos Santos[2], Iran Mendonça da Silva[1,2], Ana Maria Moura da Silva[4], Fan Hui Wen[4], Mônica Colombini[4], Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda[2,5], Wuelton Marcelo Monteiro[1,2], Luiz Carlos de Lima Ferreira[1,2,6]

1 Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, 2 Instituto de Pesquisa Clínica Carlos Borborema, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil, 3 Núcleo de Sistemas de Informação, Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil, 4 Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, 5 Instituto Leônidas e Maria Deane, FIOCRUZ Manaus, Brazil, 6 Departamento de Medicina, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil

☯ These authors contributed equally to this work.
* jac.sachett@gmail.com

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Alves EC, Sachett JdAG, Sampaio VS, Sousa JDdB, Oliveira SSd, Nascimento EFd, et al. (2018) Predicting acute renal failure in *Bothrops* snakebite patients in a tertiary reference center, Western Brazilian Amazon. PLoS ONE 13(8): e0202361. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202361

Editor: Emmanuel A Burdmann, University of Sao Paulo Medical School, BRAZIL

Received: April 21, 2018

Accepted: August 1, 2018

Published: August 17, 2018

Copyright: © 2018 Alves et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) Decision 287/2013.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Acute Kidney Injury (AKI) is the main systemic complication and cause of death in viperid envenomation. Although there are hypotheses for the development of AKI, the mechanisms involved are still not established. The aim of this study was to evaluate the clinical-laboratorial-epidemiological factors associated with AKI in victims of *Bothrops* sp envenomation. This is an observational study carried out at the Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado. AKI was defined according to the guidelines of the Acute Kidney Injury Network (AKIN). Among the 186 patients evaluated, AKI was observed in 24 (12.9%) after 48 hours of admission. Stage I was present in 17 (70.8%) patients, II in 3 (12.5%) and III in 4 (16.7%). Epidemiological characterization showed predominance of men, occurrence in rural areas, aged between 16–60 years, feet as the most affected anatomical region, and time to medical assistance less than 3 hours. Hypertension and diabetes were the comorbidities identified. Most of the accidents were classified as moderate, and clinical manifestations included severe pain, mild edema, local bleeding and headache. Laboratory results showed blood uncoagulability, hypofibrinogenemia, leukocytosis, increase of creatine kinase, and high lactate dehydrogenase levels. Multivariate analysis showed an association with high LDH levels [AOR = 1.01 (95% CI = 1.01–1.01, p<0.002)], local bleeding [AOR = 0.13 (95%CI = 0.027–0.59, p<0.009)], and the presence of comorbidities [AOR = 60.96 (95%CI = 9.69–383.30; p<0.000)]. Herein, laboratory markers such as high LDH levels along with local bleeding and comorbidities may aid in the diagnosis of AKI.

PLOS | NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial

Jacqueline A. G. Sachett[1,2], Iran Mendonça da Silva[1,2], Eliane Campos Alves[1,2], Sâmella S. Oliveira[1,2], Vanderson S. Sampaio[1,2,3], Fábio Francesconi do Vale[1,4], Gustavo Adolfo Sierra Romero[1,5], Marcelo Cordeiro dos Santos[1,2], Hedylamar Oliveira Marques[6], Mônica Colombini[7], Ana Maria Moura da Silva[7], Fan Hui Wen[7], Marcus V. G. Lacerda[1,2,8], Wuelton M. Monteiro[1,2]*, Luiz C. L. Ferreira[1,2,4]

1 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil, 2 Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, 3 Núcleo de Sistemas de Informação, Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil, 4 Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil, 5 Núcleo de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil, 6 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação Hospitalar de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, Manaus, Brazil, 7 Divisão de Desenvolvimento Científico, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil, 8 Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Brazil

* wueltonmm@gmail.com

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Sachett JAG, da Silva IM, Alves EC, Oliveira SS, Sampaio VS, do Vale FF, et al. (2017) Poor efficacy of preemptive amoxicillin clavulanate for preventing secondary infection from *Bothrops* snakebites in the Brazilian Amazon: A randomized controlled clinical trial. PLoS Negl Trop Dis 11(7): e0005745. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005745

Editor: Jean-Philippe Chippaux, Institut de Recherche pour le Développement, BENIN

Received: May 17, 2017

Accepted: June 24, 2017

Published: July 10, 2017

Copyright: © 2017 Sachett et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM PPSUS Call, Decision 287/2013). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

Secondary bacterial infections from snakebites contribute to the high complication rates that can lead to permanent function loss and disabilities. Although common in endemic areas, routine empirical prophylactic use of antibiotics aiming to prevent secondary infection lacks a clearly defined policy. The aim of this work was to estimate the efficacy of amoxicillin clavulanate for reducing the secondary infection incidence in patients bitten by *Bothrops* snakes, and, secondarily, identify risk factors for secondary infections from snakebites in the Western Brazilian Amazon.

Methods and findings

This was an open-label, two-arm individually randomized superiority trial to prevent secondary infection from *Bothrops* snakebites. The antibiotic chosen for this clinical trial was oral amoxicillin clavulanate per seven days compared to no intervention. A total of 345 patients were assessed for eligibility in the study period. From this total, 187 accomplished the inclusion criteria and were randomized, 93 in the interventional group and 94 in the untreated control group. All randomized participants completed the 7 days follow-up period. Enzyme immunoassay confirmed *Bothrops* envenoming diagnosis in all participants. Primary outcome was defined as secondary infection (abscess and/or cellulitis) until day 7 after

Accepted Manuscript

Fatal stroke after *Bothrops* snakebite in the Amazonas state, Brazil: A case report

Sâmella Silva de Oliveira, Luciana Aparecida Freitas-de-Sousa, Eliane Campos Alves, Luiz Carlos de Lima Ferreira, Iran Mendonça da Silva, Marcus Vinícius Guimarães de Lacerda, Hui Wen Fan, Ana Maria Mourada-Silva, Wuelton Marcelo Monteiro

PII: S0041-0101(17)30266-0

DOI: 10.1016/j.toxicon.2017.08.021

Reference: TOXCON 5705

To appear in: *Toxicon*

Received Date: 27 June 2017

Revised Date: 18 August 2017

Accepted Date: 21 August 2017

Please cite this article as: Silva de Oliveira, Sâ., Freitas-de-Sousa, L.A., Alves, E.C., de Lima Ferreira, L.C., da Silva, Iran.Mendonç., de Lacerda, Marcus.Viní.Guimarã., Fan, H.W., Mourada-Silva, A.M., Monteiro, W.M., Fatal stroke after *Bothrops* snakebite in the Amazonas state, Brazil: A case report, *Toxicon* (2017), doi: 10.1016/j.toxicon.2017.08.021.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

ARTICLE IN PRESS

WILDERNESS & ENVIRONMENTAL MEDICINE, ▮, ▮▮▮–▮▮▮ (2016)

CASE REPORT

Severe Hemorrhagic Syndrome After Lonomia Caterpillar Envenomation in the Western Brazilian Amazon: How Many More Cases Are There?

João Hugo A. Santos, MD, PhD; Sâmella S. Oliveira, MSc; Eliane C. Alves, MSc; Iran Mendonça-da-Silva, MD, MSc; Jacqueline A.G. Sachett, MSc; Antonio Tavares, MD; Luiz Carlos Ferreira, MD, PhD; Hui Wen Fan, MD, PhD; Marcus V.G. Lacerda, MD, PhD; Wuelton M. Monteiro, PhD

From the Directorate of Education and Research, Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil (Drs Santos, Mendonça-da-Silva, Tavares, Ferreira, Lacerda, and Monteiro); School of Health Sciences, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil (Ms Oliveira, Alves, and Sachett, and Drs Mendonça-da-Silva and Monteiro); Venoms and Antivenoms Strategic Board, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil (Dr Fan); and the Leônidas & Maria Deane Research Institute, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, Brazil (Dr Lacerda).

Contact with *Lonomia* caterpillars can cause a hemorrhagic syndrome. In Brazil, *Lonomia obliqua* and *Lonomia achelous* are known to cause this venom-induced disease. In the Brazilian Amazon, descriptions of this kind of envenomation are scarce. Herein, we report a severe hemorrhagic syndrome caused by *Lonomia* envenomation in the Amazonas state, Western Brazilian Amazon. The patient showed signs of hemorrhage lasting 8 days and required *Lonomia* antivenom administration, which resulted in resolution of hemorrhagic syndrome. Thus, availability of *Lonomia* antivenom as well as early antivenom therapy administration should be addressed across remote areas in the Amazon.

Keywords: hemorrhagic syndrome, *Lonomia*, caterpillar envenomation, antivenom, erucism

Introduction

Some larval lepidopteran insects may cause envenomation via contact with their bristles.[1] In Brazil, the national surveillance system recorded a total of 35,117 cases of caterpillar injuries between 2000 and 2013. These injuries showed notable increasing trend from 216 cases in 2000 (0.1 cases/100,000 inhabitants) to 3488 in 2013 (1.8 cases/100,000 inhabitants), possibly related to an improvement in surveillance sensitivity over time.[2] In 2013, the incidence was higher in Southern Brazil (4.2 cases/100,000 inhabitants) in comparison with the Brazilian Amazon (1.5 cases/100,000 inhabitants). The number of cases officially recorded in the Amazon is probably underestimated because of underreporting, since local indigenous and riverine populations do not have easy access to health centers.

Corresponding author: Wuelton M. Monteiro, PhD, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Avenida Pedro Teixeira 25, Dom Pedro, 69040-000, Manaus, AM, Brazil; e-mail: wueltonmm@gmail.com.

Submitted for publication June 2016.
Accepted for publication November 2016.

Most caterpillar injuries are caused by the larvae of several species belonging to the Megalopigydae and Saturniidae families. These taxa cause envenomations that have individually indistinguishable local symptomology, described as immediate burning pain, erythema, edema, and immediate lymphangitis; in later stages, there may be vesicles, bullae, erosions, petechiae, superficial skin necrosis, and ulcerations.[1] Only *Lonomia* spp (Saturniidae) can cause systemic complications, such as hemorrhagic syndrome and acute renal failure[3–6] and result in fatalities.[7] Before the introduction of specific antivenom for *Lonomia* spp, 10 fatalities attributed to hemorrhagic complications occurred among 26 workmen in Pará state (Eastern Brazilian Amazon) who were tapping rubber trees when envenomed[8]; in the Southern region, 4/155 patients envenomed by *Lonomia* died from reported massive hemorrhage.[9]

Two species of *Lonomia* are known to cause hemorrhagic syndrome: *Lonomia achelous* and *Lonomia obliqua*.[6–8] *L achelous* is found in the Amazonian portions of Brazil, Venezuela, Colombia, Peru, Ecuador, and in the Guianas.[10,11] *L obliqua* is found in the non-Amazonian area of Brazil, Paraguay, Argentina, and Uruguay[10] and can cause disseminated intravascular coagulation and a

Rev Soc Bras Med Trop 49(3):389-392, May-June, 2016
doi: 10.1590/0037-8682-0333-2015

Case Report

Hallux amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon

Wuelton Marcelo Monteiro[1],[2], *Sâmella Silva de Oliveira*[1],[2], *Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett*[1],[2], *Iran Mendonça da Silva*[1],[2], *Luiz Carlos de Lima Ferreira*[1],[2] *and Marcus Vinícius Guimarães Lacerda*[1],[2],[3]

[1]. Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Amazonas, Brasil.
[2]. Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil.
[3]. Instituto de Pesquisa Leônidas & Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz, Manaus, Amazonas, Brasil.

Abstract

Freshwater stingray injuries are a common problem in the Brazilian Amazon, affecting mostly riverine and indigenous populations. These injuries cause severe local and regional pain, swelling and erythema, as well as complications, such as local necrosis and bacterial infection. Herein, we report a case of bacterial infection and hallux necrosis, after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon, which eventually required amputation. Different antimicrobial regimens were administered at different stages of the disease; however, avoiding amputation through effective treatment was not achieved.

Keywords: Stingray envenomation. Bacterial infection. Necrosis.

INTRODUCTION

According to the Brazilian official surveillance system, out of all reported injuries from aquatic animals in the Brazilian Amazon, those from freshwater stingrays are most common (88.4%)[1]. These envenomings are most likely unreported, as it is difficult for riverine and indigenous populations living in remote areas to reach health centers for treatment of venomous animal injuries. Moreover, delays in patient care, along with the use of folk medicines may damage the wound site and often lead to local complications[2]. An epidemiological survey from Acre State, Brazil, found that stingray injuries were common accidents, with 18% of rubber tappers and 23% of Amerindians affected at least once in their lifetime[3]. Thus, it is important to assess disease burden through population- and hospital-based field studies in remote localities in order to understand the extent of complications and disabilities following those neglected injuries.

In the Brazilian Amazon, the main recorded species of freshwater stingrays bearing venomous barbs are *Paratrygon aiereba*, *Potamotrygon orbignyi*, and *Potamotrygon motoro*, which can be found in the Amazonas, Tocantins, and Negro river basins. The cururu stingrays (*Potamotrygon* sp.) and *Potamotrygon schroederi* are endemic in the Rio Negro basin[4]. The stingray's venom has necrotizing, edematous, proteolytic, neurotoxic and myotoxic effects[5],[6]. Stingray injuries immediately cause severe local signs and symptoms of immense pain and swelling[2],[7], and often lead to necrosis and secondary infections[7]. Here, we report a case of bacterial infection and hallux necrosis eventually requiring amputation after a freshwater stingray injury in the Brazilian Amazon.

CASE REPORT

We describe a case of bacterial infection requiring hallux amputation after a freshwater stingray injury in a 43-year-old man born and living in Ariquemes (Rondônia State, Brazil). Anamnesis of the patient showed absence of smoking, alcohol abuse, illicit drug use, diabetes, previous surgery, blood transfusion, and drug allergy. Information about his vaccination status was lacking. The patient suffered from systemic arterial hypertension for 5 years, for which he received no treatment; 3 years ago, he was diagnosed as a hepatitis B virus carrier.

The patient reported that he had been bathing and walking in the margins of the Canaã River in Ariquemes, when a stingray struck him in the dorsal area of his right foot. The patient described an immediate onset of intense local pain, radiating to his ipsilateral lower limb. He was seen at the local public hospital where analgesic medication and ceftriaxone (2 g/day) were prescribed. All laboratorial tests during his medical assistance are presented in **Table 1**. He had normal blood counts, with a leukocyte count of 6,000 cells/mm³ (70% neutrophils; 28% lymphocytes) and hemoglobin 12.7g/dL; normal activated clotting time (6'), and prothrombin activity of 79%. The patient remained

Corresponding author: Dr. Wuelton Marcelo Monteiro.
e-mail: wueltonmm@gmail.com
Received 29 September 2015
Accepted 27 January 2016

Accepted Manuscript

Scorpion envenoming caused by *Tityus* cf. *silvestris* evolving with severe muscle spasms in the Brazilian Amazon

Wuelton Marcelo Monteiro, Sâmella Silva de Oliveira, Guilherme Pivoto, Eliane Campos Alves, Jacqueline de Almeida Gonçalves Sachett, Cleber Nunes Alexandre, Nelson Ferreira Fé, Maria das Graças Vale Barbosa Guerra, Iran Mendonça da Silva, Antonio Magela Tavares, Luiz Carlos de Lima Ferreira, Marcus Vinícius Guimarães Lacerda

PII: S0041-0101(16)30169-6

DOI: 10.1016/j.toxicon.2016.06.015

Reference: TOXCON 5400

To appear in: *Toxicon*

Received Date: 11 April 2016

Revised Date: 20 June 2016

Accepted Date: 23 June 2016

Please cite this article as: Monteiro, W.M., de Oliveira, S.S., Pivoto, G., Alves, E.C., de Almeida Gonçalves Sachett, J., Alexandre, C.N., Fé, N.F., Barbosa Guerra, M.d.G.V., da Silva, I.M., Tavares, A.M., Ferreira, L.C.d.L., Lacerda, M.V.G., Scorpion envenoming caused by *Tityus* cf. *silvestris* evolving with severe muscle spasms in the Brazilian Amazon, *Toxicon* (2016), doi: 10.1016/j.toxicon.2016.06.015.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

PLOS | ONE

RESEARCH ARTICLE

Low Health System Performance, Indigenous Status and Antivenom Underdosage Correlate with Spider Envenoming Severity in the Remote Brazilian Amazon

Vanderson Souza Sampaio[1,2,3], André Alexandre Gomes[1,2], Iran Mendonça Silva[1,2], Jacqueline Sachett[1,2], Luiz Carlos Lima Ferreira[1,2], Sâmella Oliveira[1,2], Meritxell Sabidó[1,4], Hipócrates Chalkidis[5], Maria Graças Vale Barbosa Guerra[1,2], Jorge Luis Salinas[6], Fan Hui Wen[7], Marcus Vinícius Guimarães Lacerda[1,8], Wuelton Marcelo Monteiro[1,2]*

1 Diretoria de Ensino e Pesquisa, Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil, 2 Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, 3 Núcleo de Sistemas de Informação, Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil, 4 Department of Medical Sciences, Faculty of Medicine, Universitat de Girona, Catalunya, Spain, 5 Curso de Ciências Biológicas, Faculdades Integradas do Tapajós, Santarém, Pará, Brazil, 6 Department of Medicine, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, 7 Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, Brazil, 8 Instituto de Pesquisas Leônidas & Maria Deane, FIOCRUZ, Manaus, Brazil

* wueltonmm@gmail.com

CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Sampaio VS, Gomes AA, Silva IM, Sachett J, Ferreira LCL, Oliveira S, et al. (2016) Low Health System Performance, Indigenous Status and Antivenom Underdosage Correlate with Spider Envenoming Severity in the Remote Brazilian Amazon. PLoS ONE 11(5): e0156386. doi:10.1371/journal.pone.0156386

Editor: José María Gutiérrez, Universidad de Costa Rica, COSTA RICA

Received: February 11, 2016

Accepted: May 15, 2016

Published: May 26, 2016

Copyright: © 2016 Sampaio et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by the PPSUS Public Call (FAPEAM/SUSAM-SES-AM/MS/CNPq number 001/2013). JLS is a fellow from Fogarty Global Health [R25TW009337]. MVGL is a level 1 fellow from CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

A better knowledge of the burden and risk factors associated with severity due to spider bites would lead to improved management with a reduction of sequelae usually seen for this neglected health problem, and would ensure proper use of antivenoms in remote localities in the Brazilian Amazon. The aim of this study was to analyze the profile of spider bites reported in the state of Amazonas in the Western Brazilian Amazon, and to investigate potential risk factors associated with severity of envenomation.

Methodology/Principal Findings

We used a case-control study in order to identify factors associated with spider bite severity in the Western Brazilian Amazon from 2007 to 2014. Patients evolving to any severity criteria were considered cases and those with non-severe bites were included in the control group. All variables were retrieved from the official Brazilian reporting systems. Socioeconomical and environmental components were also included in a multivariable analysis in order to identify ecological determinants of incidence and severity. A total of 1,181 spider bites were recorded, resulting in an incidence of 4 cases per 100,000 person/year. Most of the spider bites occurred in males (65.8%). Bites mostly occurred in rural areas (59.5%). The most affected age group was between 16 and 45 years old (50.9%). A proportion of 39.7% of the bites were related to work activities. Antivenom was prescribed to 39% of the patients.

7.4.2. Capítulo de livros

Sachett JAS, **Oliveira SS**, Santos VS, Sampaio V, Monteiro WM, Lacerda MVG. Envenenamentos por serpentes e complicações renais, In: Daher EF, Barros E, Silva Jr GB (Org). Nefrologia Tropical. São Paulo: Livraria Balieiro, 2019, p. 1-317.

De Oliveira SS, Sampaio VS, Sachett JAG, Alves EC, Silva VC, Lima JAA, Silva IM, Ferreira LCL, Bernarde P, Wen HF, Lacerda MVG, Monteiro WM. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. Clinical Toxinology. Holanda: Springer Netherlands, 2016, p. 1-22.