

TEMAS TRATADOS

- ✓ Ensayos basados en TP (ensayo en una etapa de FII V, VII y X),
- ✓ Ensayos basados en TTPA (ensayo en una etapa de FXI, FXII, PK o HMWK)
- ✓ Factor XIII: Cribado, actividad y antígeno

**Ensayos basados en TP (Ensayos de una fase de FII, V, VII y X):** Las deficiencias de los factores de coagulación II, V, VII o X son trastornos hemorrágicos poco frecuentes (Mumford et al, 2014). Los ensayos para la actividad del factor II, V, VII o X se pueden realizar mediante un ensayo de una etapa basado en TP. El ensayo compara la capacidad de las diluciones de un plasma patrón o de referencia y el plasma de prueba para corregir el TP de un plasma que se sabe que es totalmente deficiente en el factor de coagulación que se está midiendo. En el ensayo de FV, por ejemplo (descrito a continuación), el plasma es deficiente en FV pero contiene cantidades normales de todos los demás factores de coagulación, incluidos II, VII, X y fibrinógeno. Los factores de coagulación II, VII y X pueden analizarse de forma similar, sustituyendo el plasma deficiente en FV en el ejemplo que se muestra a continuación por el plasma deficiente correspondiente, y utilizando un plasma de referencia (estándar) con una concentración conocida del factor que se está ensayando (Baker et al, 2020).

Reactivos:

- ✓ Plasma deficiente en FV. Esto puede ser congénitamente deficiente o artificialmente deficiente en FV (plasma envejecido).
- ✓ Solución amortiguadora Veronal de Owren (OVB).
- ✓ Plasma de prueba citratado pobre en plaquetas.
- ✓ Para el estándar, se prefiere un plasma de referencia comercial (estándar) o, si no está disponible, use un grupo de plasma normal pobre en plaquetas de 20 donantes (mantenido a -70 °C o menos).
- ✓ Control de calidad interno del plasma, ya sea comercial o de origen local (CLSI, 2016).
- ✓ Reactivo de tromboplastina que debe contener cloruro de calcio. Es una buena práctica utilizar la misma tromboplastina que se utiliza en la prueba de TP, pero se puede utilizar una tromboplastina alternativa para el diagnóstico de pacientes inusuales.

**Método:** Decantar suficiente reactivo de tromboplastina en un tubo de vidrio de 75 x 12 mm. Deje calentar a 37 ° C durante 5 minutos. Si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio, este debe agregarse por separado. Decanta suficiente M/40 CaCl<sub>2</sub> en un tubo de vidrio de 75 x 12 mm. Deje calentar a 37 ° C durante 5 minutos. Para ambas pruebas, control de calidad y plasmas estándar, prepare diluciones en tubos de plástico, como se muestra en la Tabla 32.

**Tabla 32.** Preparación de diluciones de plasma estándar, de control de calidad y de prueba para ensayos de una etapa de FII, FV, FVII y FX

Dilución	Plasma (ml)	OVB (ml)
1/5	0.1	0.4
1/10	0.1	0.9
1/20	0,5 (dilución 1/10)	0.5
1/40	0,5 (dilución 1/20)	0.5

**Nota:** Mezcle bien la dilución 1/10 antes de usarla para preparar la dilución 1/20. Mezcle bien la dilución 1/20 antes de usarla para preparar la dilución 1/40. Las diluciones plasmáticas deben analizarse inmediatamente después de la preparación. Si la temperatura ambiente supera los 25 °C, puede ser necesario mantener las diluciones en hielo derretido antes del análisis.

Pruebe cada dilución de plasma de referencia (patrón/calibrador) de la siguiente manera:

- ✓ Pipetear 0,1 ml de dilución 1/10 en un tubo de vidrio de 75 x 10 mm.
- ✓ Añadir 0,1 ml de plasma deficiente en FV.
- ✓ Calentar a 37°C durante 2 minutos.
- ✓ Añadir 0,2 ml de reactivo de tromboplastina precalentado.
- ✓ Poner en marcha el cronómetro y mezclar.

**Nota:** Si el reactivo de tromboplastina no contiene calcio, se añaden 0,1 ml de tromboplastina a la mezcla de dilución y plasma deficiente. Después de un retraso de 1 a 2 minutos para calentarse a 37 °C, la mezcla se coagula con 0,1 ml de calcio precalentado (a 37 °C).

#### Registre el tiempo de coagulación:

- Repita la dilución 1/10 y luego pruebe las diluciones 1/20 y 1/40 por duplicado.
- Repita el procedimiento para las diluciones de plasma de prueba y control de calidad. Prueba por duplicado.
- Para los plasmas de prueba que se espera que sean normales, pruebe diluciones de 1/10, 1/20 y 1/40. Para los plasmas de prueba que se espera que tengan niveles reducidos, pruebe diluciones de 1/5, 1/10 y 1/20.
- Un "blanco" también debe probarse de la siguiente manera:
  - 0,1 ml OVB
  - 0,1 ml de plasma deficiente en FV
  - 0,2 ml de reactivo de tromboplastina/calcio
- El tiempo de coagulación del "blanco" refleja la calidad del plasma deficiente y debe ser equivalente a menos de 1 UI/dl (<0,01 UI/ml).

**Resultados:** Tome un promedio de cada resultado duplicado. Los tiempos duplicados deben estar dentro del 10% entre sí para que sean aceptables. En papel logarítmico de 3 ciclos x 2 ciclos, trace los tiempos de coagulación de los plasmas de referencia, prueba y control de calidad frente a la concentración porcentual de FV. A la dilución 1/10 se le asigna arbitrariamente un valor del 100%, por lo que la 1/20 equivale al 50%, la 1/40 al 25% y la dilución 1/5 al 200%. Alternativamente, grafique la concentración en una escala logarítmica y el tiempo de coagulación en una escala lineal. La cantidad relativa de FV en el plasma de prueba en comparación con el plasma de referencia se extrapola de los gráficos. Un ejemplo de esto se muestra en la sección sobre ensayos basados en TTPA. El tiempo de coagulación equivalente a la prueba del 100% (el lugar donde la línea de prueba pasa a través de la actividad del 100%) se lee de la línea estándar (por lo tanto, la concentración de estándar que podría dar ese tiempo de coagulación en particular). Esto da la concentración de la prueba en porcentaje del estándar. Este porcentaje se multiplica por el valor de la concentración del factor de coagulación en el plasma patrón (en UI/dl) para obtener la concentración en la prueba (en UI/dl).

**Notas:** Los niveles bajos de actividad de FII, FV, FVII o FX se pueden medir en pacientes con enfermedad hepática (Kujovich et al, 2015). El rango de referencia en adultos para cada uno de estos factores de coagulación debe determinarse localmente, pero a menudo tiene un límite inferior de 50-70 UI/dl para FV, FVII y FX. El límite inferior de referencia para FII es mayor (Appel et al, 2012; Wakeman et al, 2005). La actividad del FVII puede aumentar durante el embarazo (Fu et al, 2022). Los individuos con un nivel reducido de FV también deben someterse a un ensayo de actividad de FVIII para excluir la deficiencia combinada de FV y FVIII (Zheng et al, 2013). Los factores II, VII y X dependientes de la vitamina K pueden

reducirse naturalmente al nacer, aumentando a lo largo de la infancia hasta alcanzar los niveles adultos. Los rangos de referencia pediátricos pueden establecerse localmente o tomarse de la literatura teniendo en cuenta la variación de los reactivos (Toulon et al, 2016; Atta rd et al, 2013; Di Felice et al, 2022). En algunos casos de deficiencia de FVII (FVII Padua, FVII Nagoya, FVII Tondabayashi/Shinjo), puede haber una discrepancia entre los niveles de FVII:C obtenidos, dependiendo de la fuente de tromboplastina. Por lo tanto, se recomienda el uso de tromboplastina humana sobre la base de que es más probable que los resultados reflejen la actividad in vivo. En algunos casos raros, el resultado puede ser muy bajo si se usa tromboplastina de conejo, pero más alto o normal si el ensayo utiliza tromboplastina de cerebro humano o de buey. Esta puede ser una razón por la que algunos casos de aparente deficiencia grave de FVII no presentan síntomas hemorrágicos (Balluet et al, 2020; Sevenet et al, 2017).

**Ensayos basados en TTPA (Ensayo de una fase de FXI, FXII, PK o HMWK):** La deficiencia de FXI es un trastorno hemorrágico poco frecuente (Mumford et al, 2014), mientras que las deficiencias de los factores de contacto FXII, PK y HMWK no se asocian con hemorragia (Maas et al, 2018), pero sí causan un TTAP significativamente prolongado. En esta sección se describe el ensayo de coagulación en una etapa basado en TTPA para FXI. El ensayo se basa en una comparación de la capacidad de las diluciones de plasmas estándar y de prueba para corregir el TTPA de un plasma que se sabe que es totalmente deficiente en FXI pero que contiene todos los demás factores necesarios para la coagulación normal. En el caso de los factores FXII, PK y HMWK, el ensayo es esencialmente el mismo que el del FXI de una etapa, pero se realiza sustituyendo el plasma deficiente pertinente por el plasma deficiente en FXI y seleccionando el plasma de referencia adecuado. El reactivo TTPA utilizado para el ensayo de PK no puede utilizar ácido elálgico como activador.

#### Reactivos:

- ✓ Plasma citratado de prueba pobre en plaquetas.
- ✓ Plasma estándar (de referencia).
- ✓ El plasma patrón (referencia/calibrador) utilizado debe ser un grupo de plasma preparado localmente que se mantenga a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  o menos, o un plasma estándar comercial. En cualquier caso, este plasma de referencia debe calibrarse para el ensayo de coagulación FXI en comparación con el estándar internacional actual para FXI en plasma. No es aceptable suponer que un plasma normal combinado tiene una actividad FXI de 100 UI/dl.

#### Plasma de control de calidad interno (Baker et al, 2020):

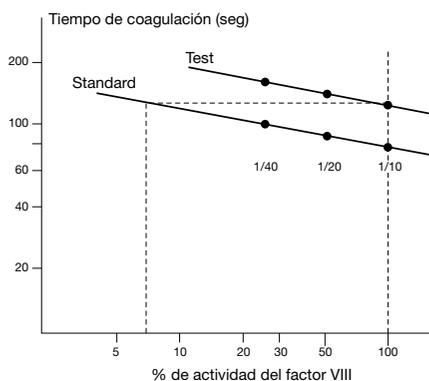
- ✓ Plasma deficiente en FXI.
- ✓ Está disponible comercialmente o puede obtenerse de un donante con deficiencias graves en las siguientes condiciones.
- ✓ El nivel de FXI es inferior a 1UI/dl, no hay antecedentes de anticuerpos anti-FXI, no recibió tratamiento durante 2 semanas, incluidas pruebas de función hepática normal en plasma.
- ✓ La función hepática anormal podría conducir a una reducción de otros factores de coagulación, que afectan a la especificidad del ensayo. Este plasma puede almacenarse en alícuotas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  o menos durante aproximadamente 3 meses (Zhao et al, 2018; Woodhams et al, 2001).
- ✓ Es preferible utilizar plasma deficiente en FXI producido por inmunodepleción de FXI a partir de plasma normal utilizando un anticuerpo monoclonal. Este tipo de material está disponible comercialmente y tiene la ventaja de una mayor seguridad viral en comparación con el plasma procedente de pacientes que han sido tratados con productos derivados del plasma.
- ✓ Sin embargo, no todos los plasmas inmunodepletados tienen  $<1\text{ UI/dl}$ , por lo que se debe tener cuidado de comprobarlo antes de su uso.
- ✓ Reactivo TTPA sensible a las deficiencias de factores (CLSI, 2016). Tenga en cuenta que los reactivos de TTPA que son activados por el ácido elálgico son insensibles a la deficiencia de PK.
- ✓ Solución salina tamponada de Owren (OBS o solución amortiguadora de glioxalina).
- ✓ 25mM  $\text{CaCl}_2$  (tenga en cuenta que Werfen  $\text{CaCl}_2$  suministrado con SynthASil es de 20mM).

## Método:

- ✓ **Para FXI, FXII y HMWK:** Realice diluciones de 1/10 de estándar, control de calidad y pruebe el plasma en solución salina tamponada en tubos de plástico. (Si se espera que el plasma de prueba tenga un nivel muy bajo de factor, comience con una dilución de 1/5). Utilizando volúmenes de 0,2 ml, realice diluciones dobles en OBS de estándar, control de calidad, y pruebe el plasma de 1/10 a 1/40 en tubos de plástico. (Mezcle bien cada dilución antes de transferirla al siguiente tubo). Las diluciones plasmáticas deben analizarse inmediatamente después de la preparación. Si la temperatura ambiente supera los 25 °C, puede ser necesario mantener las diluciones en hielo húmedo antes de la prueba.
- ✓ **Solo para PK,** generalmente se requieren diluciones más altas de 1/100, 1/200 y 1/400. Pruebe primero el plasma estándar. Pipetear 0,1 ml de cada dilución de patrón en un tubo de vidrio de 75 x 10 mm. Añadir 0,1 ml de plasma deficiente en FXI, mezclar y transferir al baño maría a 37°C. Añadir 0,1 ml de reactivo TTPA, mezclar e incubar durante 2-5 minutos dependiendo del tiempo de incubación recomendado del reactivo TTPA. Al final del tiempo de incubación, agregue 0,1 ml de CaCl<sub>2</sub>, mezcle el tubo de inclinación hasta que se vea un coágulo. Registre el tiempo de coagulación. Repita los pasos 4 a 7 con control de calidad y, a continuación, analice el plasma. También se debe establecer un "blanco" utilizando 0,1 ml de OBS en lugar de plasma de prueba. El tiempo de coagulación de la pieza en bruto debe ser más largo que el tiempo de actividad FXI del 1% de la lectura estándar del gráfico de calibración. Si el tiempo es más corto, esto indica que el plasma deficiente no es totalmente deficiente en FXI y, por lo tanto, no es un plasma de sustrato adecuado.

**Resultados:** El trazado de los resultados es el mismo que para los ensayos basados en TP (descritos anteriormente), requiriendo papel cuadriculado de doble escala logarítmica o logarítmica/lineal. Para FXI, FXII y HMWK, a la dilución 1/10 se le asigna arbitrariamente un valor del 100%, a la dilución 1/20 un valor del 50% y a la dilución 1/40 un valor del 25%. Si se utiliza, un 1/5 tiene un valor de 200%. Para PK, a la dilución 1/100 se le asigna arbitrariamente un valor de 100%, a la dilución 1/200 un valor del 50% y a la dilución 1/400 un valor del 25%. Si se utiliza, un 1/50 tiene un valor del 200%. Se deben obtener líneas rectas, paralelas entre sí. Lea la concentración de control de calidad y la muestra de prueba como para los ensayos basados en TP (descritos anteriormente). En este ejemplo, la concentración de FXI en la muestra de prueba es el 7% de la del estándar. Si el patrón tiene una concentración de 85 UI/dl, el cálculo es  $85 \text{ UI/dl} \times 7\% =$  la muestra de ensayo tiene una concentración de 6 UI/dl. Si las líneas no son paralelas, se debe repetir el ensayo. Compruebe los tiempos de coagulación de la muestra de ensayo. Si es muy largo, pruebe una dilución de 1/5 (o 1/50 para PK). Pueden producirse líneas no paralelas debido a un error técnico. Si se ha eliminado el error técnico, puede deberse a la presencia de un inhibidor, que puede actuar específicamente contra el FXI o puede ser del "tipo lupus", mostrando un patrón convergente. Las líneas divergentes son típicas de una muestra activada (Baker et al, 2020).

**Notas:** Las deficiencias de FXII, PK o HMWK no se asocian con un mayor riesgo de sangrado. Los reactivos TTPA activados con ácido elálgico son insensibles a la deficiencia de PK. Si la concentración plasmática de FXI, FXII, PK o HMWK en plasma es cercana a cero (es decir, los tiempos de coagulación de todas las diluciones son similares a los del blanco), pueden producirse líneas no paralelas. El rango de referencia normal debe establecerse localmente, pero a menudo tiene un límite inferior de 50-70 UI/dl para cada uno de estos factores. Ya se han establecido unidades internacionales para FXI y FXII en plasma, pero no hay planes para establecer unidades internacionales para PK o HMWK.



**Figura 20.** Gráfico del ensayo FXI

### Factor XIII (FXIII): exámenes de cribado, actividad y antígeno

**FXIII Screen (pruebas de solubilidad en coágulos):** FXIII media la reticulación de las cadenas a e y de fibrina. La deficiencia de FXIII se clasifica como un trastorno hemorrágico raro y puede estar causada por mutaciones en las subunidades catalíticas del FXIII-A o en las subunidades portadoras del FXIII-B (Karimi et al, 2018). Actualmente no se recomienda el uso de pruebas cualitativas de solubilidad en coágulos de fibrina debido a la falta de estandarización y la poca sensibilidad. Se recomienda que la deficiencia de FXIII se diagnostique mediante un ensayo de actividad funcional de FXIII en lugar de solubilidad en coágulos (Mumford et al, 2014; Pal la et al, 2015; Kohler et al, 2011), pero en algunas zonas del mundo solo se dispone de ensayos de solubilidad en coágulos. Las pruebas de solubilidad en coágulos que contienen urea 5M son más específicas que las que contienen ácido acético, sin embargo, la hipofibrinogenemia y la disfibrinogenemia pueden causar resultados falsos positivos en la prueba basada en urea (Dorgalaleh et al, 2016). Las pruebas de solubilidad en coágulos que contienen ácido monocloroacético (MCA) al 1% son más sensibles y rápidas que las pruebas basadas en urea (Dorgalaleh et al, 2016). Se ha sugerido que tanto las pruebas basadas en urea como en ácido acético deben realizarse en paralelo para optimizar el diagnóstico (Dorgalaleh et al, 2016). Solo se observará un resultado positivo en la deficiencia grave de FXIII, con una actividad de FXIII de <5-10 UI/dl, dependiendo del método utilizado.

**Método:** La trombina y el calcio son necesarios para activar el FXIII de modo que se entrecruza con la fibrina en una forma estable. En este método, a pesar de utilizar plasma citrato, todavía hay suficientes iones de calcio disponibles para la activación de FXIII. Se utiliza un plasma anticoagulado normal con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) para el control. En este plasma, el EDTA da lugar a una quelación completa de los iones de calcio, lo que significa que el FXIII no es capaz de reticularmente la fibrina. La adición de ácido acético al 2% o urea 5M da como resultado la lisis de coágulos no reticulados, mientras que el plasma citratado con >10 U/dl de actividad FXIII tiene un coágulo insoluble. La prueba es generalmente más sensible si se emplea ácido acético (en lugar de urea), ya que el coágulo se disolverá a niveles más altos de FXIII en presencia de ácido acético (Jennings et al, 2003).

#### Materiales/reactivos:

- ✓ Tubos de vidrio de 75 x 10 mm
- ✓ 0,9% solución salina
- ✓ 30 U/ml de trombina
- ✓ Plasma de EDTA normal
- ✓ 2% Ácido acético

**Método:** Añada 0,2 ml de plasma citrato a 0,2 ml de solución salina al 0,9% en un tubo de vidrio. Para un control positivo, repita con 0,2 ml de plasma EDTA. Para un control negativo, repita con 0,2 ml de plasma citrato normal. Añada 0,1 ml de 30 U/ml de trombina, mezclar. Dejar actuar durante 30 minutos a

37°C. Golpee los tubos para aflojar los coágulos de los lados. Añada 5 ml de ácido acético al 2% y tapar el tubo. Deje a temperatura ambiente durante 12 horas.

**Resultados:** El plasma con EDTA no debe tener ningún coágulo visible. El plasma citratado normal debe tener un coágulo intacto y visible. Si el coágulo no es visible, el sujeto tiene deficiencia de FXIII.

**Rango normal:** Los sujetos normales tienen un coágulo visible después de 12 horas en ácido acético al 2%.

**Notas:** Se puede utilizar urea 5M en lugar de ácido acético al 2%. El tiempo de incubación para la disolución del coágulo es de 18 horas. Este método es menos sensible pero más específico que el ácido acético (descrito anteriormente). La coagulación con calcio y la lisis con urea producen resultados anormales solo cuando los niveles de FXIII están por debajo de 5 U/dl. En comparación, la coagulación con 30 U/ml de trombina seguida de lisis con ácido acético al 2% produce resultados anormales a niveles inferiores a 10 U/dl (Jennings et al, 2003). Ocasionalmente, los pacientes con niveles de FXIII por encima de 5 U/dl pueden sangrar (ver Bolton-Maggs et al, 2004 para una revisión). Los pacientes con hipofibrinogenemia o afibrinogenemia deben ser excluidos de las pruebas mediante estas pruebas.

**Ensayo de actividad FXIII:** FXIII media la reticulación de las cadenas  $\alpha$  e  $\gamma$  de fibrina. La deficiencia de FXIII se clasifica como un trastorno hemorrágico raro y puede estar causada por mutaciones en las subunidades catalíticas del FXIII-A o en las subunidades portadoras del FXIII-B (Karimi et al, 2018; Mumford et al, 2014). Los métodos disponibles actualmente para el diagnóstico de laboratorio clínico de la deficiencia de FXIII incluyen ensayos de solubilidad en coágulos, ensayos cuantitativos de actividad del FXIIIa, ensayos de antígenos del FXIII específicos para el complejo FXIII-A<sub>2B2</sub>, ¿FXIII-A?, o FXIII-B?, y pruebas genéticas (Palla et al, 2015). Se recomienda que la deficiencia de FXIII se diagnostique mediante un ensayo de actividad funcional de FXIII en lugar de solubilidad en coágulos (Mumford et al, 2014; Kohler et al, 2011; Dorgalaleh et al, 2016). La mayoría de los ensayos de actividad FXIII solo son sensibles a las deficiencias de la subunidad FXIII-A. El fibrinógeno se recubre en la superficie de una placa de microtitulación. La fijación no específica se evita mediante un agente de bloqueo especial. El FXIII en la muestra es activado por la trombina y los iones de calcio. En la etapa de incorporación, FXIIIa en el plasma de prueba incorpora el sustrato, 5-biotinamidopentilamina (BAPA), en el fibrinógeno del sustrato FXIII recubierto en la placa en presencia de calcio. La cantidad de BAPA incorporado es proporcional a la actividad FXIII de la muestra de prueba. En el siguiente paso, un conjugado Strept-AP (estreptavidina-fosfatasa alcalina) se une al BAPA incorporado.

La fosfatasa alcalina convierte el sustrato sintético pNPP (p-nitro fenil fosfato) en fosfato y p-nitrofenol, que se puede medir a 405 nm. Los reactivos para el método que se describe a continuación están disponibles comercialmente en forma de kit (ensayo de incorporación Pefakit FXIII. Pentapharm, Suiza). Tenga en cuenta que hay otros ensayos de actividad disponibles de otros fabricantes, incluido el kit Berichrom FXIII (Siemens, Marburgo, Alemania), la liberación de amoníaco y el ensayo fluorogénico de actividad Technofluor FXIII (Technoclone, Viena, Austria)

**Reactivos:** Todos los reactivos necesarios están contenidos en el kit comercial.

#### Método:

Día 1

- ✓ Deje que los componentes del kit alcancen la temperatura ambiente durante 30 minutos.
- ✓ Reconstituya el reactivo de recubrimiento (R2) en agua destilada, según el volumen recomendado por el fabricante.
- ✓ Añada 100  $\mu$ l de reactivo de recubrimiento por pocillo a los pocillos vacíos de las tiras de placa de microtitulación.
- ✓ Congele cualquier exceso de reactivo de recubrimiento para su uso posterior. Se mantiene estable durante 6 meses a -20°C.

- ✓ Selle las tiras con el sello de plástico provisto e incube durante la noche (14 a 16 horas) a temperaturas de 20-25 ° C.

## Día 2

- ✓ Diluya 20 veces concentrado TBS R1 (solución salina tamponada tris) 50 ml en 950 ml de agua destilada o en un volumen menor, si es necesario.
- ✓ Diluya 3 ml del reactivo bloqueante R3 con 27 ml de TBS R1 diluido. Congela el exceso de R3.
- ✓ Deseche el reactivo de recubrimiento de la placa de microtitulación, invierta la tira y golpee el tejido para eliminar los residuos.
- ✓ Añada 300 µl de reactivo bloqueante diluido a cada pocillo.
- ✓ Incube durante 1-1,5 horas a 37°C en una incubadora.
- ✓ Reconstituya el calibrador R10 en 0,5 ml de agua destilada y los tres controles, R11, R12 y R13, en 0,2 ml de agua destilada.
- ✓ Descongele los plasmas de prueba congelados a 37 °C durante 5 minutos antes del análisis.
- ✓ Prepare un recipiente con unos cientos de ml de mezcla de hielo y agua como un baño de hielo.
- ✓ Realice diluciones de todos los plasmas de prueba y control, 10 µl de plasma y 1 ml de tampón TBS R1 diluido (dilución 1:101). Mezcla de vórtice.
- ✓ Realice las diluciones del calibrador de la siguiente manera:

Cal 1: 30 µl R10-t 970 µl TBS R1

Cal 2: 20 µl R10-t 980 µl TBS R1

Cal 3: 75 µl R10-t 25 µl TBS R1

Cal 4: 25 µl R10-t 75 µl TBS R1

Cal 5: 10 µl R10 + 90 µl TBS R1

**Nota:** Las diluciones 1 y 2 están listas para usar. Diluir aún más 10 µl de diluciones del calibrador 3-5 en 1 ml TBS R1. Lave la placa tres veces con 300 µl/pocillo TBS R1. Invierta y golpee el pañuelo para eliminar el exceso de líquido. Reconstituya el reactivo activador parte A (R4) y parte B (R5) en 5 ml de agua destilada cada uno. Continúe derritiendo el baño de hielo / hielo de agua durante no más de 30 minutos. Agregue 25 µl de cada calibrador, control o plasma de prueba en los pocillos apropiados. Incluya un espacio en blanco de TBS R1. Mezcle los reactivos activadores parte A y B (R4 y R5) para formar el reactivo de incorporación final. Añada 75 µl de reactivo de incorporación final a cada pocillo, incluido el pocillo del blanco. Incubar durante 30 minutos a 37°C en incubadora. Agregue 200 µl/pocillo de solución de detención de incorporación R6. Mezclar suavemente durante 10 minutos en la coctelera de platos. Reconstituya el reactivo de detección R7 añadiendo 12 ml de agua destilada. Congele el R7 diluido sin usar. Lave la placa cuatro veces con TBS de 300 µl/pocillo. Golpee para eliminar el exceso de líquido. Añada 100 µl/pocillo de reactivo de detección R7. Incubar durante 15 minutos a 37°C en la incubadora. Lave la placa cuatro veces con TBS de 300 µl/pocillo. Golpee para eliminar el exceso de líquido. Prepare la solución de sustrato inmediatamente antes de usar:

- ✓ Para 96 pocillos (plato lleno), añadir 9 comprimidos R8b a 22,5 ml de tampón dietanolamina R8a
- ✓ Para 64 pocillos (8 tiras), añadir 6 comprimidos a 15 ml de dietanolamina
- ✓ Para 32 pocillos (4 tiras), añadir 3 comprimidos a 7,5 ml de dietanolamina
- ✓ Para 24 pocillos (3 tiras), añadir 2 comprimidos a 5 ml de dietanolamina

Agregue 180 µl/pocillo de solución de sustrato. Incubar durante 11 minutos a 37°C en la incubadora. Agregue 50 µl/solución de tope de pocillo (4M NaOH) R9. Lea densidades ópticas en 15 minutos a 405 nm en un lector de placas de microtitulación.

**Nota:** Varios reactivos de kit se pueden almacenar ultracongelados para su uso posterior, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, el sustrato, las partes A y B del reactivo activador, los calibradores y los controles no deben congelarse. Los kits de reactivos parciales que contienen estos últimos materiales se pueden comprar para su uso con cualquier reactivo parcialmente utilizado que se haya congelado. Esto reduce el costo por prueba si las muestras de prueba se analizan en lotes pequeños.

**Cálculo de resultados:** Las diluciones del calibrador y los valores de control se suministran con cada kit. Utilizando un software de manejo de datos adecuado o papel cuadriculado, construya una curva de calibración trazando la concentración contra la densidad óptica (DO) de las diluciones del calibrador después de restar la DO del blanco. Utilice una escala lineal-lineal. Reste la DO del blanco de la DE de la muestra de prueba/diluciones de control y convierta la DO en actividad FXIII, utilizando la curva de calibración. Los resultados del paciente pueden ser aceptados si los valores de la muestra de control están dentro del rango aceptable.

## Referencias

Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini S, Shamsizadeh M. Directrices para el diagnóstico de laboratorio de la deficiencia del factor XIII. *Fibrinólisis de coágulos sanguíneos* 2016; 27(4): 361-364.

Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini MS, Farshi Y, Roshanzamir F, Naderi M, Kazemi A, Zaker F, Aghideh AN, Shamsizadeh M. Diagnóstico de la deficiencia del factor XIII. *Hematología* 2016; 21(7): 430-439.

Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE. Problemas relacionados con el diagnóstico de laboratorio de la deficiencia del factor XIII: un estudio NEGAS del Reino Unido. *J Thromb Haemost* 2003; 1(12): 2603-2608.

Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Diagnóstico de la deficiencia del factor XIII: desafíos y herramientas. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.

Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnóstico y clasificación de las deficiencias del factor XIII. *J Thromb Haemost* 2011; 9(7): 1404-1406.

Mumford AD, Ackroyd S, Alikhan R, Bowles L, Chowdary P, Grainger J, Mainwaring J, Mathias M, O'Connell N. Guía para el diagnóstico y tratamiento de los trastornos raros de la coagulación: una guía de la Organización de Médicos del Centro de Hemofilia del Reino Unido en nombre del Comité Británico de Estándares en Hematología. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.

Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Trastornos hemorrágicos raros: diagnóstico y tratamiento. *Sangre* 2015; 125(13): 2052-2061.