

TÓPICOS ABORDADOS

- ✓ Ensaios Baseados em TP (Ensaio de Um Estágio de FII, V, VII e X)
- ✓ Ensaios Baseados em TTPA (Ensaio de Um Estágio de FXI, FXII, PKK ou HMWK)
- ✓ Fator XIII: Triagem, Atividade e Antígeno

Ensaios Baseados em TP (Ensaio de Um Estágio de FII, V, VII e X): deficiências dos fatores de coagulação II, V, VII ou X são distúrbios hemorrágicos raros (Mumford et al, 2014). Os ensaios de atividade dos fatores II, V, VII ou X podem ser realizados usando um ensaio de um estágio baseado em TP. O ensaio compara a capacidade de diluições de um plasma padrão ou de referência e plasma de teste para corrigir o TP de um plasma conhecido por ser totalmente deficiente no fator de coagulação que está sendo medido. No ensaio de FV, por exemplo (descrito abaixo), o plasma é deficiente em FV, mas contém quantidades normais de todos os outros fatores de coagulação, incluindo II, VII, X e fibrinogênio. Os fatores de coagulação II, VII e X podem ser testados de forma semelhante, substituindo o plasma deficiente em FV no exemplo dado abaixo pelo plasma deficiente correspondente e usando um plasma de referência (padrão) com concentração conhecida do fator que está sendo testado (Baker et al, 2020).

Reagentes:

- ✓ Plasma deficiente em FV. Pode ser congênita ou artificialmente deficiente em FV (plasma envelhecido).
- ✓ Tampão veronal de Owren (OVb).
- ✓ Plasma de teste citratado pobre em plaquetas.
- ✓ Para o padrão, é preferível um plasma de referência (padrão) comercial ou, se indisponível, um pool de plasma normal pobre em plaquetas de 20 doadores (mantido a -70°C ou menos).
- ✓ Plasma de controle de qualidade interno - comercial ou de origem local (CLSI, 2016).
- ✓ Reagente de tromboplastina que deve conter cloreto de cálcio. A melhor prática é usar a mesma tromboplastina usada no teste de TP, mas uma tromboplastina alternativa pode ser usada para o diagnóstico de pacientes incomuns.

Método: decante reagente de tromboplastina suficiente em um tubo de vidro de 75 x 12 mm. Deixar aquecer a 37°C por 5 minutos. Se o reagente de tromboplastina não contiver cálcio, este deverá ser adicionado separadamente. Decante CaCl_2 M/40 suficiente em um tubo de vidro de 75 x 12 mm. Deixar aquecer a 37°C por 5 minutos. Para os dois testes, CQ e plasmas padrão, preparar as diluições em tubos plásticos, conforme mostrado na Tabela 32.

Tabela 32. Preparação de diluições de plasma de teste, CQ e padrão para ensaios de um estágio de FII, FV, FVII e FX

Diluição	Plasma (mL)	OVb (mL)
1/5	0,1	0,4
1/10	0,1	0,9
1/20	0,5 (diluição 1/10)	0,5
1/40	0,5 (diluição 1/20)	0,5

Observação: misture bem a diluição 1/10 antes de usá-la para preparar a diluição 1/20. Misture bem a diluição 1/20 antes de usá-la para preparar a diluição 1/40. As diluições de plasma devem ser testadas imediatamente após a preparação. Se a temperatura ambiente exceder 25°C, pode ser necessário manter as diluições em gelo derretido antes da análise.

Teste cada diluição do plasma de referência (padrão/calibrador) da seguinte forma:

- ✓ Pipete 0,1 mL da diluição 1/10 para um tubo de vidro de 75 x 10 mm.
- ✓ Adicione 0,1 mL de plasma deficiente em FV.
- ✓ Aqueça a 37°C por 2 minutos.
- ✓ Adicione 0,2 mL de reagente de tromboplastina pré-aquecido.
- ✓ Acione o cronômetro e misture.

Observação: se o reagente de tromboplastina não contiver cálcio, 0,1 mL de tromboplastina é adicionado à mistura de diluição e plasma deficiente. Após um intervalo de 1 a 2 minutos para aquecimento a 37°C, a mistura é coagulada com 0,1 mL de cálcio pré-aquecido (a 37°C).

Registre o tempo de coagulação:

- Repita a diluição 1/10 e, em seguida, teste as diluições 1/20 e 1/40 em duplicata.
- Repita as diluições do plasma de teste e de CQ. Teste em duplicata.
- Para plasmas de teste que devem ser normais, teste as diluições 1/10, 1/20 e 1/40. Para plasmas de teste que devem ter níveis reduzidos, teste as diluições 1/5, 1/10 e 1/20.
- Um "branco" também deve ser testado da seguinte forma:
 - 0,1 mL de OVB
 - 0,1 mL de plasma deficiente em FV
 - 0,2 mL de reagente de tromboplastina/cálcio
- O tempo de coagulação do "branco" reflete a qualidade do plasma deficiente e deve ser equivalente a menos de 1 UI/dL (<0,01 UI/mL).

Resultados: calcule a média de cada resultado duplicado. Os tempos das duplicatas devem estar dentro de 10% entre si para serem aceitáveis. Em papel logarítmico de 3 ciclos x 2 ciclos, plote os tempos de coagulação dos plasmas de referência, teste e CQ em relação à concentração percentual de FV. A diluição 1/10 recebe arbitrariamente o valor de 100%, portanto, a diluição 1/20 equivale a 50%, 1/40 a 25% e 1/5 a 200%. Como alternativa, plote a concentração em escala logarítmica e o tempo de coagulação em escala linear. A quantidade relativa de FV no plasma de teste em comparação com o plasma de referência é extrapolada a partir dos gráficos. Um exemplo disso é mostrado na seção sobre ensaios baseados em TTPA. O tempo de coagulação equivalente a 100% do teste (o ponto onde a linha de teste passa pela atividade de 100%) é lido a partir da linha padrão (portanto, a concentração do padrão que poderia fornecer aquele tempo de coagulação específico). Isso resulta na concentração do teste em porcentagem do padrão. Essa porcentagem é multiplicada pelo valor da concentração do fator de coagulação no plasma padrão (em UI/dL) para obter a concentração no teste (em UI/dL).

Observações: baixos níveis de atividade de FII, FV, FVII ou FX podem ser medidos em pacientes com doença hepática (Kujovich et al, 2015). A faixa de referência de cada um desses fatores de coagulação para adultos deve ser determinada localmente, mas frequentemente tem limite inferior de 50–70 UI/dL para FV, FVII e FX. O limite inferior de referência para FII é maior (Appel et al, 2012; Wakeman et al, 2005). A atividade de FVII pode aumentar durante a gravidez (Fu et al, 2022). Indivíduos com nível reduzido de FV também devem fazer um ensaio de atividade de FVIII para excluir deficiência combinada de FV e FVIII (Zheng et al, 2013). Os fatores II, VII e X dependentes de vitamina K podem ser naturalmente reduzidos ao nascimento, aumentando ao longo da infância até atingir os níveis de adultos. Faixas de referência para crianças podem ser estabelecidas localmente ou obtidas da literatura, levando-se em consideração a variação dos reagentes (Toulon et al, 2016; Attard et al, 2013; Di Felice et al, 2022). Em alguns casos de deficiência de FVII (FVII Padua, FVII Nagoya, FVII Tondabayashi/Shinjo), pode haver discrepância entre os níveis de FVII:C obtidos, dependendo da fonte de tromboplastina. Portanto, o uso de tromboplastina humana é aconselhável visto que os resultados têm maior probabilidade de refletir a atividade *in vivo*. Em alguns casos raros, o resultado pode ser muito baixo se for utilizada tromboplastina de coelho, mas mais alto ou normal se o ensaio utilizar tromboplastina humana ou de cérebro de boi. Esse pode ser o motivo pelo qual alguns casos de deficiência aparentemente grave de FVII não apresentam sintomas de sangramento (Balluet et al, 2020; Sevenet et al, 2017).

Ensaio Baseado em TTPA (Ensaio de Um Estágio de FXI, FXII, PKK ou HMWK): a deficiência de FXI é um distúrbio hemorrágico raro (Mumford et al, 2014), enquanto deficiências dos fatores de contato FXII, PKK e HMWK não estão associadas a sangramento (Maas et al, 2018), mas causam TTPA significativamente prolongado. O ensaio de coagulação baseado em TTPA de um estágio para FXI é descrito nesta seção. O ensaio se baseia na comparação da capacidade de diluições de plasmas padrão e de teste para corrigir o TTPA de um plasma conhecido por ser totalmente deficiente em FXI, mas que contém todos os outros fatores necessários para a coagulação normal. Para os fatores FXII, PKK e HMWK, o ensaio é essencialmente o mesmo que o do FXI de um estágio, mas é realizado pela substituição do plasma deficiente relevante pelo plasma deficiente em FXI e pela seleção do plasma de referência apropriado. O reagente de TTPA utilizado no ensaio de PKK não pode usar ácido elágico como ativador.

Reagentes:

- ✓ Plasma de teste citratado pobre em plaquetas.
- ✓ Plasma padrão (de referência).
- ✓ O plasma padrão (de referência/calibrador) utilizado deve ser um pool de plasma preparado localmente e mantido a -40°C ou menos, ou um plasma padrão comercial. Em ambos os casos, esse plasma de referência deve ser calibrado para o ensaio de coagulação de FXI de acordo com o padrão internacional vigente para FXI no plasma. Não é aceitável presumir que um pool de plasma normal tenha atividade de FXI de 100 UI/dL.

Plasma de controle de qualidade interno (Baker et al, 2020):

- ✓ Plasma deficiente em FXI.
- ✓ Disponível comercialmente ou pode ser coletado de um doador com deficiência grave nas seguintes condições.
- ✓ Nível de FXI menor que 1 UI/dL, sem histórico de anticorpos anti-FXI, sem tratamento por 2 semanas, incluindo testes de função hepática normais.
- ✓ Função hepática anormal pode ocasionar redução de outros fatores de coagulação, o que afeta a especificidade do ensaio. Esse plasma pode ser armazenado em alíquotas a -20°C ou menos por aproximadamente 3 meses (Zhao et al, 2018; Woodhams et al, 2001).
- ✓ É preferível utilizar plasma deficiente em FXI produzido por imunodepleção de FXI de plasma normal utilizando um anticorpo monoclonal. Esse tipo de material está disponível comercialmente e tem a vantagem de maior segurança viral em comparação com o plasma proveniente de pacientes que foram tratados com produtos derivados de plasma.
- ✓ Contudo, nem todos os plasmas imunodepletados são <1 UI/dL, e é preciso ter cuidado ao verificar isso antes do uso.
- ✓ Reagente de TTPA sensível a deficiências de fatores (CLSI, 2016). Observe que os reagentes de TTPA ativados por ácido elágico são insensíveis à deficiência de PKK.
- ✓ Solução salina tamponada de Owren (OBS ou tampão glioxalina).
- ✓ CaCl_2 25 mM (observe que o CaCl_2 da Werfen fornecido com SynthASil é 20 mM).

Método:

- ✓ **Para FXI, FXII e HMWK:** faça diluições 1/10 de plasma padrão, de CQ e de teste em solução salina tamponada, em tubos plásticos (se for esperado que o plasma de teste tenha um nível muito baixo de fator, comece com uma diluição 1/5). Usando volumes de 0,2 mL, faça diluições duplas em OBS de plasma padrão, de CQ e de teste, de 1/10 a 1/40, em tubos plásticos (misture bem cada diluição antes de transferir para o próximo tubo.) As diluições de plasma devem ser testadas imediatamente após a preparação. Se a temperatura ambiente exceder 25°C, pode ser necessário manter as diluições em gelo úmido antes do teste.
- ✓ **Somente para PKK:** diluições maiores de 1/100, 1/200 e 1/400 são geralmente necessárias. Teste o plasma padrão primeiro. Pipete 0,1 mL de cada diluição do padrão em um tubo de vidro de 75 x 10 mm. Adicione 0,1 mL de plasma deficiente em FXI, misture e transfira para um banho-maria a 37°C. Adicione 0,1 mL de reagente de TTPA, misture e incube por 2-5 minutos, dependendo do tempo de incubação recomendado para o reagente de TTPA. Ao final do tempo de incubação, adicione 0,1 mL de CaCl_2 , misture e incline

o tubo até que um coágulo seja visível. Registre o tempo de coagulação. Repita as etapas 4-7 usando o plasma de CQ e depois o plasma de teste. Um "branco" também deve ser preparado utilizando 0,1 mL de OBS no lugar do plasma de teste. O tempo de coagulação do branco deve ser maior que o tempo de 1% de atividade de FXI do padrão lido no gráfico de calibração. Se o tempo for menor, isso indica que o plasma deficiente não é totalmente deficiente em FXI e, portanto, não é um plasma substrato adequado.

Resultados: a representação gráfica dos resultados é igual à dos ensaios baseados em TP (descritos acima) e requer papel milimetrado com escala logarítmica dupla ou logarítmica/linear. Para FXI, FXII e HMWK, a diluição 1/10 recebe arbitrariamente o valor de 100%, a diluição 1/20, o valor de 50%, e a diluição 1/40, o valor de 25%. Se utilizada, a diluição 1/5 tem o valor de 200%. Para PKK, a diluição 1/100 recebe arbitrariamente o valor de 100%, a diluição 1/200, o valor de 50%, e a diluição 1/400, o valor de 25%. Se utilizada, a diluição 1/50 tem o valor de 200%. Linhas retas, paralelas entre si, devem ser obtidas. Leia a concentração do CQ e da amostra de teste como nos ensaios baseados em TP (descritos acima). Nesse exemplo, a concentração de FXI na amostra de teste é 7% daquela no padrão. Se o padrão tiver uma concentração de 85 UI/dL, o cálculo é $85 \text{ UI/dL} \times 7\% =$ a amostra de teste tem concentração de 6 UI/dL. Se as linhas não forem paralelas, o ensaio deve ser repetido. Verifique os tempos de coagulação da amostra de teste. Se forem muito longos, teste uma diluição 1/5 (ou 1/50 para PKK). Linhas não paralelas podem ocorrer devido a erro técnico. Se o erro técnico tiver sido eliminado, pode ser devido à presença de um inibidor, que pode agir especificamente contra o FXI ou pode ser do "tipo lúpico", apresentando um padrão convergente. Linhas divergentes são típicas de uma amostra ativada (Baker et al, 2020).

Observações: deficiências de FXII, PKK ou HMWK não estão associadas a risco aumentado de sangramento. Os reagentes de TTPA ativados por ácido elágico são insensíveis à deficiência de PKK. Se a concentração de FXI, FXII, PKK ou HMWK no plasma de teste for próxima de zero (ou seja, os tempos de coagulação de todas as diluições forem semelhantes ao branco), podem ocorrer linhas não paralelas. A faixa de referência normal deve ser estabelecida localmente, mas frequentemente tem limite inferior de 50–70 UI/dL para cada um desses fatores. Unidades Internacionais já foram estabelecidas para FXI e FXII no plasma, mas não há planos de estabelecer unidades internacionais para PKK ou HMWK.

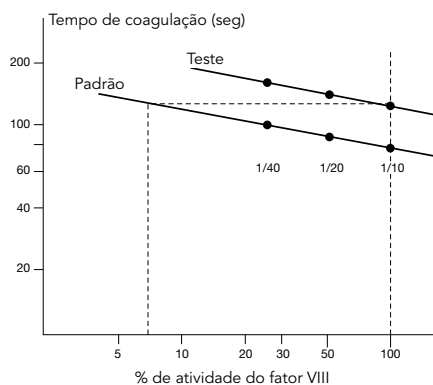


Figura 20. Gráfico do ensaio de FXI

Fator XIII (FXIII): Triagem, Atividade e Antígeno

Triagem de FXIII (testes de solubilidade do coágulo): o FXIII medeia a reticulação das cadeias α e γ de fibrina. A deficiência de FXIII é classificada como um distúrbio hemorrágico raro e pode ser causada por mutações nas subunidades catalíticas A do FXIII ou nas subunidades transportadoras B do FXIII (Karimi et al, 2018). Atualmente, testes qualitativos de solubilidade do coágulo de fibrina não são recomendados para uso em razão da falta de padronização e da baixa sensibilidade. Recomenda-se que a deficiência de FXIII seja diagnosticada por meio de um ensaio funcional de atividade do FXIII em vez de solubilidade do coágulo (Mumford et al, 2014; Palla et al, 2015; Kohler et al, 2011), mas em algumas regiões do mundo apenas ensaios de solubilidade do coágulo estão disponíveis. Testes de solubilidade do coágulo contendo ureia 5M são mais específicos do que aqueles contendo ácido acético, porém, hipofibrinogenemia e disfibrinogenemia podem causar resultados falso-positivos no teste à base de ureia (Dorgalaleh et al, 2016). Testes de

solubilidade do coágulo contendo ácido monocloroacético (MCA) a 1% são mais sensíveis e rápidos do que os testes à base de ureia (Dorgalaleh et al, 2016). Foi sugerido que os testes à base de ureia e ácido acético sejam realizados em paralelo para otimizar o diagnóstico (Dorgalaleh et al, 2016). Resultado positivo só será observado em casos de deficiência grave de FXIII, com atividade de FXIII <5-10 UI/dL, dependendo do método utilizado.

Método: trombina e cálcio são necessários para ativar o FXIII de forma que ele reticule a fibrina em uma forma estável. Nesse método, apesar do uso de plasma citratado, íons de cálcio suficientes ainda estão disponíveis para ativação do FXIII. Plasma normal anticoagulado com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é usado como controle. Nesse plasma, o EDTA resulta em quelação completa dos íons de cálcio, o que significa que o FXIII não consegue reticular a fibrina. A adição de ácido acético a 2% ou ureia 5M resulta na lise de coágulos não reticulados, enquanto o plasma citratado com >10 U/dL de atividade de FXIII apresenta um coágulo insolúvel. O teste é geralmente mais sensível se for utilizado ácido acético (em vez de ureia), uma vez que o coágulo se dissolverá em níveis mais elevados de FXIII na presença de ácido acético (Jennings et al, 2003).

Materiais/reagentes:

- ✓ Tubos de vidro de 75 x 10 mm
- ✓ Solução salina a 0,9%
- ✓ Trombina 30 U/mL
- ✓ Plasma normal com EDTA
- ✓ Ácido acético a 2%

Método: adicione 0,2 mL de plasma citratado de teste a 0,2 mL de solução salina a 0,9% em um tubo de vidro. Para o controle positivo, repita com 0,2 mL de plasma com EDTA. Para o controle negativo, repita com 0,2 mL de plasma citratado normal. Adicione 0,1 mL de trombina 30 U/mL e misture. Deixe em repouso por 30 minutos a 37°C. Agite os tubos para soltar os coágulos das laterais. Adicione 5 mL de ácido acético a 2% e tampe o tubo. Deixe em temperatura ambiente por 12 horas.

Resultados: o plasma com EDTA não deve apresentar coágulo visível. O plasma citratado normal deve apresentar um coágulo intacto e visível. Se o coágulo não for visível, o indivíduo tem deficiência de FXIII.

Faixa normal: indivíduos normais apresentam um coágulo visível após 12 horas em ácido acético a 2%.

Observações: ureia 5M pode ser usada no lugar de ácido acético a 2%. O tempo de incubação para dissolução do coágulo é de 18 horas nesse caso. Este método é menos sensível, mas mais específico do que o ácido acético (descrito acima). A coagulação com cálcio e a lise com ureia produzem resultados anormais somente quando os níveis de FXIII estão abaixo de 5 U/dL. Em comparação, a coagulação com trombina 30 U/mL seguida de lise com ácido acético a 2% produz resultados anormais em níveis abaixo de 10 U/dL (Jennings et al, 2003). Ocasionalmente, pacientes com níveis de FXIII acima de 5 U/dL podem apresentar sangramento (consulte Bolton-Maggs et al, 2004 para revisão). Pacientes com hipofibrinogenemia ou afibrinogenemia devem ser excluídos dos testes por esses testes.

Ensaio de atividade do FXIII: o FXIII medeia a reticulação das cadeias α e γ de fibrina. A deficiência de FXIII é classificada como um distúrbio hemorrágico raro e pode ser causada por mutações nas subunidades catalíticas A do FXIII ou nas subunidades transportadoras B do FXIII (Karimi et al, 2018; Mumford et al, 2014). Os métodos atualmente disponíveis para diagnósticos clínicos laboratoriais de deficiência de FXIII incluem ensaios de solubilidade do coágulo, ensaios quantitativos de atividade do FXIIIa, ensaios de antígeno de FXIII específicos para o complexo FXIII-A2B2, FXIII-A2 ou FXIII-B2, e testes genéticos (Palla et al, 2015). Recomenda-se que a deficiência de FXIII seja diagnosticada por meio de um ensaio funcional de atividade do FXIII em vez de solubilidade do coágulo (Mumford et al, 2014; Kohler et al, 2011; Dorgalaleh et al, 2016). A maioria dos ensaios de atividade do FXIII é sensível apenas a deficiências da subunidade A do FXIII. A superfície de uma placa de microtitulação é revestida com fibrinogênio. Ligação não específica é impedida por um agente bloqueador especial. O FXIII na amostra é ativado por trombina e íons de cálcio. Na etapa de incorporação, o FXIIIa no plasma de teste incorpora o substrato, 5-biotinamidopentilamina (BAPA), ao substrato fibrinogênio de FXIII revestido na placa na presença de cálcio. A quantidade de BAPA incorporada é proporcional à atividade do FXIII da amostra de teste. Na etapa seguinte, um conjugado Strept-AP (estreptavidina-fosfatase alcalina) é ligado ao BAPA

incorporado. A fosfatase alcalina converte o substrato sintético pNPP (p-nitrofenil fosfato) em fosfato e p-nitrofenol, que podem ser medidos a 405 nm. Os reagentes para o método descrito abaixo estão disponíveis comercialmente na forma de kit (Pefakit ensaio de incorporação de FXIII, Pentapharm, Suíça). Observe que estão disponíveis outros ensaios de atividade de outros fabricantes, incluindo o kit Berichrom FXIII (Siemens, Marburg, Alemanha) para liberação de amônia e o ensaio fluorogênico de atividade do FXIII Technoflur (Technoclone, Viena, Áustria).

Reagentes: todos os reagentes necessários estão incluídos no kit comercial.

Método:

Dia 1

- ✓ Deixe os componentes do kit atingirem a temperatura ambiente por 30 minutos.
- ✓ Reconstitua o reagente de revestimento (R2) em água destilada, de acordo com o volume recomendado pelo fabricante.
- ✓ Adicione 100 µL de reagente de revestimento por poço aos poços vazios das tiras da placa de microtitulação.
- ✓ Congele o excesso de reagente de revestimento para uso posterior. Ele permanece estável por 6 meses a -20°C.
- ✓ Sele as tiras com o lacre plástico fornecido e incube durante a noite (14 a 16 horas) em temperaturas de 20–25°C.

Dia 2

- ✓ Dilua 50 mL de TBS R1 (solução salina tamponada com tris) concentrado 20x em 950 mL de água destilada ou em um volume menor, se necessário.
- ✓ Dilua 3 mL do reagente de bloqueio R3 com 27 mL de TBS R1 diluído. Congele o excesso de R3.
- ✓ Descarte o reagente de revestimento da placa de microtitulação, inverta a tira e bata levemente no tecido para remover os resíduos.
- ✓ Adicione 300 µL de reagente de bloqueio diluído a cada poço.
- ✓ Incube por 1-1,5 horas a 37°C em uma incubadora.
- ✓ Reconstitua o calibrador R10 em 0,5 mL de água destilada e os três controles, R11, R12 e R13, em 0,2 mL de água destilada.
- ✓ Descongele os plasmas de teste congelados a 37°C por 5 minutos antes da análise.
- ✓ Prepare um recipiente com algumas centenas de mL de uma mistura de gelo/água como banho de gelo.
- ✓ Faça diluições de todos os plasmas de teste e controle, 10 µL de plasma e 1 mL de tampão TBS R1 diluído (diluição 1:101). Misture em vórtex.
- ✓ Faça diluições do calibrador da seguinte forma:

Cal 1: 30 µL de R10 + 970 µL de TBS R1

Cal 2: 20 µL de R10 + 980 µL de TBS R1

Cal 3: 75 µL de R10 + 25 µL de TBS R1

Cal 4: 25 µL de R10 + 75 µL de TBS R1

Cal 5: 10 µL de R10 + 90 µL de TBS R1

Observação: as diluições 1 e 2 estão prontas para uso. Dilua ainda mais 10 µL das diluições dos calibradores 3–5 em 1 mL de TBS R1. Lave a placa três vezes com 300 µL/poço de TBS R1. Inverta e bata levemente no tecido para remover o excesso de líquido. Reconstitua o reagente ativador parte A (R4) e parte B (R5) em 5 mL de água destilada cada. Mantenha em banho de gelo derretido/água gelada por no máximo 30 minutos. Adicione 25 µL cada de plasma calibrador, de controle ou teste nos poços apropriados. Inclua um branco de TBS R1. Misture os reagentes ativadores parte A e B (R4 e R5) para formar o reagente de incorporação final. Adicione 75 µL do reagente de incorporação final a cada poço, inclusive ao poço do branco. Incube por 30 minutos a 37°C na incubadora. Adicione 200 µL/poço de solução de interrupção da incorporação R6. Misture delicadamente por 10 minutos no agitador de placas. Reconstitua o reagente de detecção R7 adicionando 12 mL de água destilada. Congele o R7 diluído não utilizado. Lave a placa

quatro vezes com 300 µL/poço de TBS. Retire o excesso de líquido. Adicione 100 µL/poço de reagente de detecção R7. Incube por 15 minutos a 37°C na incubadora. Lave a placa quatro vezes com 300 µL/poço de TBS. Retire o excesso de líquido. Prepare a solução de substrato imediatamente antes do uso:

- ✓ Para 96 poços (placa inteira), adicione 9 comprimidos R8b a 22,5 mL de tampão dietanolamina R8a
- ✓ Para 64 poços (8 tiras), adicione 6 comprimidos a 15 mL de dietanolamina
- ✓ Para 32 poços (4 tiras), adicione 3 comprimidos a 7,5 mL de dietanolamina
- ✓ Para 24 poços (3 tiras), adicione 2 comprimidos a 5 mL de dietanolamina

Adicione 180 µL/poço de solução de substrato. Incube por 11 minutos a 37°C na incubadora. Adicione 50 µL/poço de solução de interrupção (NaOH 4M) R9. Leia as densidades ópticas em 15 minutos a 405 nm em um leitor de placas de microtitulação.

Observação: vários reagentes do kit podem ser armazenados congelados para uso posterior, conforme descrito acima. No entanto, o substrato, o reagente ativador partes A e B, os calibradores e os controles não devem ser congelados. Kits de reagentes parciais contendo esses materiais podem ser adquiridos para uso com quaisquer reagentes parcialmente usados que tenham sido congelados. Isso reduz o custo por teste se as amostras de teste forem analisadas em pequenos lotes.

Cálculo dos resultados: as diluições dos calibradores e os valores de controle são fornecidos com cada kit. Utilizando um software de tratamento de dados adequado ou papel milimetrado, construa uma curva de calibração plotando a concentração em relação à densidade óptica (DO) das diluições dos calibradores após subtrair a DO do branco. Utilize uma escala linear-linear. Subtraia a DO do branco das DOs das diluições da amostra de teste/controle e converta as DOs em atividade do FXIII, utilizando a curva de calibração. Os resultados do paciente podem ser aceitos se os valores da amostra de controle estiverem dentro da faixa aceitável.

Referências

- Dorgalaleh A, Tabibian S, Hosseini S, Shamsizadeh M. Guidelines for laboratory diagnosis of factor XIII deficiency. *Blood Coagul Fibrinolysis* 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. Diagnosis of factor XIII deficiency. *Hematology* 2016; 21(7): 430-439.
- Jennings I, Kitchen S, Woods TA, Preston FE. Problems relating to the laboratory diagnosis of factor XIII deficiency: A UK NEGAS study. *J Thromb Haemost* 2003; 1(12): 2603-2608.
- Karimi M, Peyvandi F, Naderi M, Shapiro A. Factor XIII deficiency diagnosis: Challenges and tools. *Int J Lab Hematol* 2018; 40(1): 3-11.
- Kohler HP, Ichinose A, Seitz R, Ariens RA, Muszbek L. Diagnosis and classification of factor XIII deficiencies. *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. Guideline for the diagnosis and management of the rare coagulation disorders: A United Kingdom Haemophilia Centre Doctors' Organization guideline on behalf of the British Committee for Standards in Haematology. *Br J Haematol* 2014; 167(3): 304-326.
- Palla R, Peyvandi F, Shapiro AD. Rare bleeding disorders: Diagnosis and treatment. *Blood* 2015; 125(13): 2052-2061.