

## PROPÓSITO DE EMPLEO

PAKAUTO® es un ensayo cualitativo en fase sólida inmuno-enzimático (ELISA) diseñado para detectar autoanticuerpos plaquetarios eluidos de plaquetas de paciente o circulando en el suero o plasma del paciente.

Para Uso en Diagnóstico *In Vitro*.

## RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La Trombocitopenia autoinmune (AITP) es una de las más comunes causas de trombocitopenia inmune. Aproximadamente la mitad de los casos de AITP ocurren en asociación con otras condiciones como linfoma, lupus sistémico eritematoso (SLE) e infección por HIV; el resto de casos puede considerarse idiopático. Sobre la base de la presentación clínica, el AITP se puede clasificar en dos tipos: AITP aguda, una enfermedad infantil habitualmente autolimitada, y AITP crónica en adultos que remite espontáneamente en raras ocasiones.

La mayoría de anticuerpos asociados con AITP reconocen las glicoproteínas de membrana plaquetaria, especialmente GPIIb/IIIa, GPIb/IX, y GPIa/IIa.<sup>1,2</sup> Los anticuerpos reactivos con estas dianas se pueden detectar a menudo en el plasma de pacientes con AITP,<sup>1,2,3,4,5</sup> pero es preferible caracterizar las inmunoglobulinas asociadas a plaquetas para confirmar auto-reactividad. Muchos test para identificación de inmunoglobulinas asociadas a plaquetas adolecen de especificidad dando a menudo resultados positivos en pacientes con tipos no-inmunes de trombocitopenia.<sup>2</sup>

PAKAUTO® microcubetas ELISA en Fase sólida contiene glicoproteínas IIB/IIIa, Ib/IX, y Ia/IIa capturadas monoclonalmente. El ensayo está diseñado para detectar autoanticuerpos plaquetarios glicoproteína específicos en suero o plasma de paciente, o eluidos de la superficie de sus plaquetas.

## PRINCIPIO

Se añade suero, plasma, o eluato a microcubetas tapizadas con con glicoproteínas plaquetarias permitiendo, si estuviera presente, que el anticuerpo se enlace. Los anticuerpos no ligados se eliminan por lavado. Se añade a los pocillos un reactivo anti-inmunoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina (Anti-IgG/A/M) y se incuba. La Anti-IgG/A/M no ligada se elimina por lavado y se añade el sustrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Tras un período de incubación de 30 minutos, se para la reacción añadiendo una solución de hidróxido sódico. Con un espectrofotómetro se mide la densidad óptica del color desarrollado.

## REACTIVOS

Número máximo de test por kit: 5

Los reactivos deben conservarse según las instrucciones de la etiqueta.

- |            |  |
|------------|--|
| <b>MS</b>  | 1. Microcubetas: tiras de microcubetas de fondo plano a las cuales se han inmovilizado glicoproteínas plaquetarias IIB/IIIa, Ib/IX, y Ia/IIa. Las tiras de las microcubetas están dentro de la bolsa embalaje. Listo para el uso.  |
| <b>TCW</b> | 2. Solución Concentrada de Lavado (10x): Solución tamponada de Tris (hidroximetil) aminometano conteniendo cloruro sódico y Tween 20. 1% azida sódica. Diluir con agua desionizada o destilada antes del uso. Almacenar la solución de trabajo de Lavado hasta 48 horas a temperatura ambiente o hasta siete días entre 2 y 8°C. |
| <b>SD</b>  | 3. Diluyente de Muestra: Solución salina tamponada de Fosfato conteniendo albúmina bovina y suero de ratón. 0.1% azida sódica. Lista para el uso.  |
| <b>SB</b>  | 4. Tampón Sustrato: Esta solución contiene dietanolamina y cloruro magnésico. 0.02% azida sódica. Listo para el uso. Proteger de la luz.   |
| <b>SS</b>  | 5. Solución de Paro: Hidróxido Sódico 3 M. Listo par el uso. Manipular con cuidado.  |
| <b>AH</b>  | 6. Conjugado: Anticuerpo de cabra a Inmunoglobulina Humana purificado por afinidad conjugado con Fosfatasa Alcalina (IgG/A/M).0.1% azida sódica. Diluir con Diluyente de Muestra antes del uso.  |

- |            |  |
|------------|--|
| <b>RCP</b> | 7. Resuspensión Celular y Solución Conservante: Solución salina tamponada de Fosfato conteniendo EDTA. 0.1% azida sódica. Lista para el uso.   |
| <b>BS</b>  | 8. Solución tamponada: Solución Tris conteniendo albúmina bovina. 0.1% azida sódica.   |
| <b>ES</b>  | 9. Solución de Elutado: Tampón de glicina con pH bajo.   |
| <b>PN</b>  | 10. PNPP (p-nitrofenil fosfato) Substrato: Polvo Cristalino. Reconstituir con agua desionizada o destilada y diluir en tampón de Substrato antes del uso. Proteger de la luz.                                  |
| <b>PC</b>  | 11. Suero Control Positivo: Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar.   |
| <b>NC</b>  | 12. Suero Control Negativo: Suero Humano. 0.1% azida sódica. Diluir en diluyente de Muestra antes de usar.   |
| <b>PCP</b> | 13. Control Plaquetas Positivo (Control de Eluato Positivo ): plaquetas humanas de tapizadas con anticuerpos secadas al vacío. Rehidratar antes del empleo con Resuspensión de Celular y Solución Conservante. |
| <b>NCP</b> | 14. Control Plaquetas Normal (Control de Eluato Negativo ): plaquetas humanas de pool secadas al vacío. Rehidratar antes del empleo con Resuspensión de Celular y Solución Conservante.                        |
| <b>PS</b>  | 15. Tapas para placas.   |

### PRECAUCIONES

- No utilizar reactivos turbios o contaminados.
- **SE DEBE** tener cuidado de evitar la contaminación del Diluyente de Muestra y del Conjugado. La contaminación inadvertida de estos reactivos con suero humano o plasma provocaría la neutralización del Conjugado y el fallo de la prueba.
- No usar reactivos después de su fecha de caducidad.
- Las microcubetas y los reactivos contenidos en el kit no pueden usarse en otros kits de otros sistemas.
- La sustitución de los componentes suministrados en el kit por cualquier otro puede provocar resultados erróneos o inconsistentes.
- Después de cada serie de análisis desechar los restos no utilizados de Conjugado diluido, Controles positivo y negativo diluidos, y reactivo PNPP diluido y reconstituido.
- Seguir las instrucciones del fabricante de las pipetas en cuanto a aspiración y dispensación para la preparación correcta de las diluciones.
- La reacción Enzima substrato de la última incubación es sensible a la temperatura y debería realizarse entre 22 y 25°C.
- Puede ser necesario que el laboratorio establezca tiempos de incubación más largos o más cortos, debido a las variaciones en instrumentos o en la temperatura de la habitación para obtener resultados de controles consistentemente válidos. Debido a que la temperatura de la incubación final puede afectar a los valores de los controles, es importante monitorizar periódicamente la temperatura de la habitación.

### CUIDADO

- Todos los sueros humanos utilizados en los Controles Positivo y Negativo para este producto han sido testados y encontrados negativos para los anticuerpos a HIV, HCV y HBsAg mediante métodos aprobados por la FDA. De todas formas ninguna prueba puede ofrecer completa seguridad de ausencia de virus de HIV, Hepatitis C, Hepatitis B u otros agentes infecciosos. Por tanto, estos materiales deberían manipularse como potencialmente infecciosos.
- Algunos de los reactivos del kit contienen azida sódica como conservante.  
**ATENCIÓN:** La azida sódica reacciona con las cañerías de cobre y plomo formando azidas metálicas latamente explosivas. Cuando se deseche en el fregadero deberá enjuagarse con gran cantidad de agua para prevenir el crecimiento de azidas. La azida sódica es un veneno y es tóxica si se ingiere.
- La solución de paro (NaOH) es corrosiva. Evitar el contacto con la piel y los ojos. Las salpicaduras deberían lavarse inmediatamente.
- Al terminar desechar todos los componentes siguiendo la normativa local.

## **TOMA DE MUESTRA**

La sangre se debe recolectar en EDTA (plasma, plaquetas) o sin anticoagulante (suero) utilizando la técnica aséptica y debería analizarse fresca lo antes posible para minimizar la posibilidad de obtener reacciones falsos positivos o falsos negativos debido al deficiente almacenaje o contaminación de la muestra. Las muestras de suero o plasma que no puedan ser testadas inmediatamente deberán ser congeladas o almacenadas en refrigeración a una temperatura de entre 2° y 8°C hasta un máximo de 48 horas.

Las muestras congeladas a -20°C o inferior, permanecen en buenas condiciones por varios años (2-3 años). De todas formas, para evitar el efecto nocivo de repetidos ciclos descongelación/congelación, se recomienda alicuotar las muestras en pequeños volúmenes y conservarlas congeladas. Evitar los congeladores antiescarcha.

Para almacenamiento o transporte, el suero o plasma debe ser separado de las células rojas.

Las partículas o agregados en la muestra pueden provocar falsos positivos o poca repetibilidad. Las muestras conteniendo partículas deberán aclararse por centrifugación antes de analizarlas.

Las muestras contaminadas por microorganismos, hemolizadas, lipémicas, ictericas o inactivadas por calor pueden dar resultados inconsistentes y deberían evitarse.

Para la preparación de eluatos plaquetarios se requieren como mínimo  $1 \times 10^7$  de plaquetas (recomendable  $5 \times 10^7$  de plaquetas). Se pueden obtener suficiente muestra de pacientes con un número  $\geq 10,000/\mu\text{L}$  de plaquetas recogiendo sangre en dos tubos de 7 mL.

NOTA: En el transporte de muestras de sangre pueden reducirse las plaquetas. Cuando se transporten muestras, es recomendable recolectar mayor cantidad para asegurarse una elución plaquetaria adecuada.

## **PROCEDIMIENTO**

### **Materiales Suministrados:**

Los viales pueden contener más reactivo que el indicado en las etiquetas. Al preparar las soluciones, asegurarse de medir el reactivo con los instrumentos apropiados.

1. 6 – 2 x 8 Tiras de Mirocubetas con soporte
2. 1 x 50 mL Soluc. Conc. Lavado
3. 1 x 14 mL Diluyente de Muestra
4. 1 x 14 mL Tampón Substrato
5. 1 x 14 mL Solución de Paro
6. 1 x 80  $\mu\text{L}$  Conjugado Anti-IgG/A/M Humana
7. 1 x 50 mL Resuspensión Celular y Solución Conservante
8. 1 x 2.5 mL Solución Tamponada
9. 1 x 2.5 mL Solución de Elutado
10. 3 x 50 mg PNPP Substrato
11. 1 x 0.3 mL Suero Control Positivo
12. 1 x 0.7 mL Suero Control Negativo
13. 1 Control Positivo Plaquetas (Control Positivo Eluato)
14. 1 Control Normal Plaquetas (Control Negativo Eluato )
15. 6 Tapas para Placas

### **Material Necesario Adicionalmente:**

1. Tubos para la muestra del paciente y diluciones de controles y reactivos
2. Pipetas de transferencia
3. Micropipetas ajustables para dispensar 10 – 100  $\mu\text{L}$  y 100 – 1,000  $\mu\text{L}$  y puntas desechables
4. Cronómetro
5. Lector de microplacas capaz de medir DO a 405 o 410 y 490 nm
6. Agua desionizada o destilada
7. Toallitas papel absorbente
8. Lavador de microplacas o similar
9. Centrifuga capaz de separar suero o plasma de las muestras de paciente
10. Baño de agua de 37°C o incubador
11. Tubos microcentrífuga
12. Microcentrífuga para preparar la pastilla de plaquetas
13. Plaquetas normales ( $5 \times 10^7$ ) para control de elución

## Procedimiento del Test

1. Atemperar los reactivos a temperatura ambiente.
2. Prepara la Solución de Lavado diluyendo el concentrado de lavado. Añadir 1 volumen de Concentrado de Lavado a 9 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
3. Determinar el número de muestras a testar. Utilizando la Tabla de Resultados, asignar a cada muestra una localización consistiendo de una columna. Registrar la identidad de cada muestra en la Tabla de Resultados.

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y CONTROLES

4. Diluir como sigue y mezclar bien:

	Volumen Diluyente de Muestra	Volumen Muestra
PC	150 µL	50 µL
NC	300 µL	100 µL
Suero o Plasma Paciente	300 µL	100 µL

5. Preparar pastillas de plaquetas del paciente o de un donante normal de la siguiente forma:
  - a) Preparar plasma rico en plaquetas (PRP) centrifugando muestras de sangre EDTA a 110 – 150 rcf durante 10 – 15 minutos.
  - b) Transferir el PRP a un tubo limpio de polipropileno y centrifugar a 10,600 rcf durante 5 – 10 minutos para obtener un botón de plaquetas. Eliminar el plasma.
  - c) Añadir 500 µL de CRP a la pastilla de plaquetas y mezclar suavemente con una pipeta de orificio pequeño. Transferir la suspensión de plaquetas a un tubo Microfuge y lavar 3 veces con al menos 500 µL de Resuspensión Celular y Solución Conservante (CRP).
  - d) Después del ultimo lavado, preparar una pastilla de plaquetas conteniendo entre  $1$  y  $5 \times 10^7$  plaquetas. Esto puede hacerse resuspendiendo las plaquetas con CRP y ajustando el contaje de plaquetas a 10,000 – 50,000 plaquetas por µL. Transferir 1 mL a un tubo microfuge y centrifugar por 5 min a 10,600 rcf para apelmazar. (Alternativamente, una pastilla de 5-10 µL de plaquetas debe contener suficientes plaquetas para la elusión. Comparar la pastilla a un tubo idéntico conteniendo 5-10 µL Diluyente de Muestra.)
6. Preparar pastillas de control de plaquetas:
  - a) Añadir 500 µL de Resuspensión Celular y Solución Conservante al Control Positivo Plaquetas (Control Positivo Eluato) y en caso necesario, el Control Normal Plaquetas (Control Negativo Eluato). Dejar atemperar al menos 10 minutos para rehidratar. Agitar para resuspender y centrifugar a 10,600 rcf durante 5 - 10 minutos. Decantar o aspirar el sobrante y sacudir el tampón restante para obtener un botón seco de plaquetas.

NOTA: Es preferible usar plaquetas frescas normales para el Control Negativo Eluato, pero se suministran plaquetas liofilizadas para las ocasiones en que no están disponibles plaquetas normales.

7. Preparar los eluatos:
  - a) Antes de proceder, asegurarse que todas las pastillas de plaquetas están bien sedimentadas y todo el CRP sobrante se ha eliminado.
  - b) Añadir 180 µL de Solución de Elusión a cada botón de plaquetas y mezclar con ayuda de una pipeta. Dejar atemperar la mezcla 2 minutos. Centrifugar a 10,600 rcf 5 - 10 minutos en tubo Microfuge.
  - c) A continuación transferir los sobrenadantes (eluatos) a un tubo limpio microfuge y añadir 180 µL de Solución Tamponada a cada tubo. Mezclar con cuidado. Centrifugar a 10,600 rcf durante 10 minutos en un tubo microfuga para eliminar cualquier resto de plaquetas.
8. Analizar inmediatamente o congelar para analizar en el futuro. Los eluatos de plaquetas se conservan congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para futuras pruebas.

NOTA: No diluir los eluatos.

9. Sacar las microcubetas el marco de microcubetas de la bolsa. Sacar las microcubetas de la bolsa y rápidamente separar las tiras no necesarias y colocarlas en la bolsa protectora.

NOTA: Solo se suministra el marco con el kit. No desechar hasta haber utilizado todas las tiras.

NOTA: Orientar el marco con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Asegurarse de que todas las tiras están correctamente situadas y encajadas en el marco. Etiquetar o enumerar cada tira para evitar errores. Mantener la misma orientación de la placa durante todo el test.

10. Añadir 300 µL de Solución de Lavado de trabajo a todos los pocillos y dejar que alcance la temperatura ambiente en 5-10 minutos.

11. Aspirar o decantar vigorosamente e invertir sobre un papel absorbente para evitar que se seque.

12. Añadir 50 µL del eluato apropiado o control diluido o muestra en las cubetas de una de las columnas indicadas en el dibujo 1.

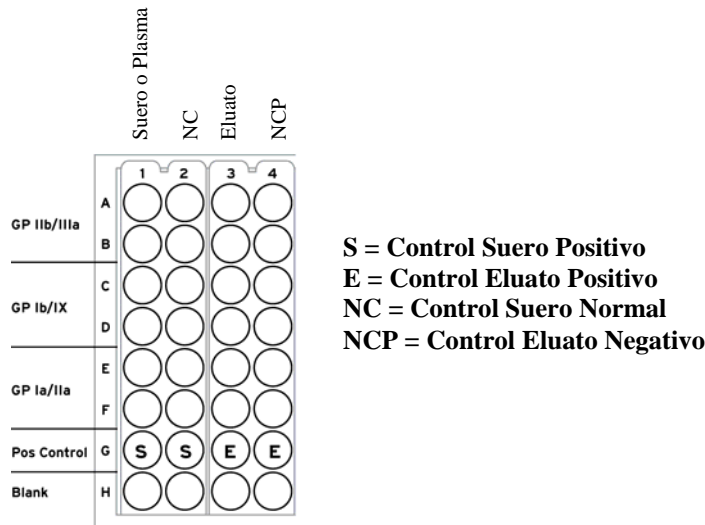


Fig. 1

NOTA: No añadir ni muestras ni reactivos a las cubetas de blanco.

NOTA: Si se analizan múltiples muestras de pacientes solo se necesita un solo set de controles. PARA EVITAR ERRORES MARCAR CADA UNA DE LAS TIRAS.

13. Sellar las microcubetas con una tapa para placas e incubar por 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. En caso de utilizar un incubador seco aumentar 10 minutos el tiempo de incubación.

14. Diluir el Conjugado 1 a 100 en Diluyente de Muestra. Utilizar un contenedor de polipropileno.

Tiras:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
AH	20 µL	60 µL
SD	2.0 mL	6.0 mL

NOTA: El conjugado es viscoso. Mojar la punta de pipeta 2-3 veces en el Conjugado antes de dispensar y enjuagar después de la adición al Diluyente de Muestra. Mezclar bien.

15. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- Añadir 300 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c para un total de 3 o 4 lavados.
- Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

NOTA: Es importante eliminar completamente toda la solución de Lavado después del último lavado.

16. Añadir 50 µL de Conjugado diluido (preparado en el paso previo) a todos los pocillos EXCEPTO los designados como BLANCOS.
16. Sellar las microcubetas con una Tapa para placas e incubar 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. Si se usa un incubador seco debe aumentarse en 10 minutos el tiempo de incubación.
17. Disolver el Substrato PNPP añadiendo 0.5 mL de agua desionizada o destilada al vial. Volver a tapar y mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.
18. Diluir el PNPP 1 a 100 en el Tampón de Substrato.

Tiras:	2 – 2 x 8	6 – 2 x 8
PN	40 µL	120 µL
SB	4.0 mL	12.0 mL

Mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.

#### 19. PASO DE LAVADO:

- a) Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- b) Añadir 300 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- c) Aspirar o decantar.
- d) Repetir los pasos b + c para un total de 3 o 4 lavados.
- e) Decantar vigorosamente para eliminar la solución de lavado residual. Invertir sobre papel absorbente para prevenir el secado.

Proceder rápidamente con los siguientes tres pasos.

20. Añadir 100 µL de la solución de PNPP diluida a todos los pocillos EXCEPTO aquellos designados como BLANCOS.
21. Dejar atemperar las microcubetas en oscuridad por 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE (22 y 25°C).

NOTA: Después de la adición de PNPP el tiempo de incubación y la temperatura son críticos. **NO VARIAR** el tiempo de incubación establecido o la temperatura. Para mayor consistencia empezar a medir el tiempo después de la adición del reactivo a la primera cubeta.

22. Parar la reacción añadiendo 100 µL de Solución de Paro a cada pocillo en la misma secuencia que la adición del sustrato. Añadir 200 µL de Solución de Paro a los pocillos de blanco.
23. Leer la absorbancia (DO) de cada pocillo a 405 o 410 nm utilizando un filtro de referencia de 490 nm. Si no se puede leer el resultado inmediatamente, volver a poner los pocillos en oscuridad hasta un máximo de 30 minutos.
24. Restar los valores obtenidos en los pocillos BLANCOS a todos los de las muestras y controles. Muchos lectores de ELISA están programados para realizar este paso automáticamente.
25. Registrar los Resultados en la Tabla de Resultados.

#### CONTROL DE CALIDAD

El Control de calidad del PAKAUTO® está integrado en el sistema por la inclusión de los Sueros Control Negativo y Positivo. Estos controles deben incluirse en cada serie para ayudar a determinar si se han producido errores técnicos o fallos del reactivo.

Criterios para un test válido:

	Control Negativo	Control Positivo
Eluato	≤ 0.100 (IIb/IIIa fila)	≥ 1.000
Suero	≤ 0.160 (IIb/IIIa fila)	≥ 1.000

Las lecturas de DO obtenidas de pruebas en duplicado deben quedar entre el 20% de la media de los dos valores. Las muestras cuyos resultados queden fuera de este límite deberán volver a determinarse.

NOTA: La pobre repetitividad de resultados se puede deber a omisiones de muestra o reactivo, desigual adición de reactivos, temperatura desigual durante las incubaciones, luz durante la incubación final o contaminación cruzada. El fallo en el test en duplicado puede conducir a aceptar resultados erróneos.

## **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

Los resultados con valores de DO iguales o mayores que 2X el valor obtenido de la media de controles negativos de la correspondiente glicoproteína (2 valores de control negativo para cada glicoproteína). Se consideran resultados positivos.

## **LIMITACIONES**

Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana del material, períodos de incubación inadecuados, lavado o decantado inadecuado de los pocillos, exposición del sustrato a la luz, omisión de reactivos, exposición a temperaturas superiores o inferiores a las requeridas, exceso o defecto de plaquetas, u omisión de pasos.

La presencia de inmunocomplejos u otros agregados de inmunoglobulinas en la muestra del paciente puede provocar un aumento de uniones no específicas y producir falso-positivos en esta prueba.

Los resultados de este análisis no deberían usarse como única base para una decisión clínica.

Algunos anticuerpos de títulos bajos, baja avididad pueden no detectarse utilizando este ensayo.

Este producto está diseñado específicamente para detectar autoanticuerpos eluidos de las plaquetas del paciente. Por tanto, una reacción positiva obtenida solo con el suero o plasma del paciente no indica necesariamente la presencia de un autoanticuerpo. Los aloanticuerpos plaqueta-específicos pueden ser también reactivos con esta prueba.

PAKAUTO® está diseñado para detectar autoanticuerpos reactivos con glicoproteínas de plaquetas IIb/IIIa, Ib/IX, y Ia/IIa. Los autoanticuerpos a otras proteínas plaquetarias no se espera reaccionen en esta prueba.

Es posible que un autoanticuerpo dé un resultado falso negativo en esta prueba debido al impedimento estérico de los autoanticuerpos humanos por los anticuerpos monoclonales murinos usados para capturar las glicoproteínas.

## **CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICO**

Cuando se almacena adecuadamente y se utiliza de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, este producto puede autoanticuerpos a glicoproteínas plaquetarias.

Para asegurar la adecuada reactividad y especificidad, cada lote de PAKAUTO® se analiza antes de comercializarlo con muestras conocidas que contienen autoanticuerpos o aloanticuerpos que reaccionan con las glicoproteínas identificadas en la Tabla de Resultados adjunta así como con muestras conocidas que no contienen tales anticuerpos.

## **Evaluación de Rendimiento**

		Método Comparativo		
		Positivo	Negativo	Total
PAKAUTO®	Positivo	24	1	25
	Negativo	23	49	72
	Total	47	50	97

Acuerdo: 75.3%

Co-positividad: 51.1%      Co-negatividad: 98%

Método Comparativo: PAIgG = IgG\* Asociada a Plaquetas (Citometría de Flujo)

\*PAIgG tiene un bajo valor predictivo para ITP.<sup>6,7</sup>

## **REFERENCIAS**

1. George JN, El-Harake MA, Raskob GE: N. Engl J. Med 331:1207, 1994.
2. George JN, El-Harake MA, Aster RH: Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms. In Williams Hematology, E Boytler, et al., eds, 5<sup>th</sup> ed, McGraw-Hill, 1995, p 1315.
3. Bussel JP, Schreiber AD: Immune thrombocytopenic purpura. In Hematology: Basic Principles and Practice, R. Hoffman, et al., eds, Churchill Livingstone, Inc., New York, 1991, p 1485.
4. McMillan R, Imback PA: Immune thrombocytopenic purpura. In Thrombosis and Hemorrhage, J. Loscalzo and Al Schafer, eds, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994, p 575.
5. Aster RH: The immunologic thrombocytopenias. In Platelet Immunology, TJ Kunicki, JN George, eds, Lipincott, Philadelphia, 1989, p 387.
6. Kelton JG, Powers PJ, Carter CJ: A Prospective Study of the Usefulness of the Measurement of Platelet-Associated IgG for the Diagnosis of Ideopathic Thrombocytopenia Purpura. Blood 1982; 60 No.4: 1050.
7. McMillan R, et.al. Platelet associated and Plasma Anti-Glycoprotein Autoantibodies in Chronic ITP. Blood, 1987; 70 No.4: 1040.

**U.S. Patent #5,514,557**



**GTi DIAGNOSTiCS®**

Good science starts with people.®

**PAKAUTO®**

- **PARA USO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO***
- **ALMACENAR A 2 y 8°C**

20925 Crossroads Circle, Suite 200  
Waukesha, WI 53186-4054 USA  
(262) 754-1000 o 1-800-233-1843



REF

PAKAUTO

Rev. 2007-08-08 (S)



Qarad b.v.b.a.  
Volmolenheide 13  
B-2400 Mol  
Belgium

**[www.gtidiagnostics.com](http://www.gtidiagnostics.com)**