

# PF4 IgG<sup>TM</sup>

## Anwendungsbereich

PF4 IgG<sup>TM</sup> ist ein qualitativer Suchtest zum Nachweis von Heparin assoziierten IgG-Antikörpern in humanem Serum.

Zum in-vitro Gebrauch.

## Zusammenfassung und Erläuterungen

Patienten entwickeln unter Heparintherapie, die wenigstens eine Woche dauert, häufig eine Thrombozytopenie.<sup>1,2,3</sup> In einigen Fällen fallen die Thrombozytenzahlen nur geringfügig ab und erholen sich schnell wieder auch unter laufender Heparintherapie. In diesem Fall spricht man von einer HIT TYP I.<sup>2</sup> Sie ist nicht Antikörper vermittelt.

Bei anderen Patienten ist die Thrombozytopenie wesentlich ernster und Antikörper vermittelt. In diesem Fall spricht man von einer HIT TYP II. Patienten mit einer HIT Typ II sind unter laufender Heparintherapie stark Thrombozytopenie und Thrombose (arteriell und venös) gefährdet, wenn die Therapie fortgesetzt werden muss. HIT-II assoziierte Antikörper können auf verschiedenen Wegen nachgewiesen werden. Die gängigsten Methoden sind der Plättchen-Aggregationstest,<sup>4</sup> der Serotonin Release Assay (SRA),<sup>5</sup> der HIPA und der Plättchenfaktor (PF4) ELISA.<sup>6,7,8</sup>

Es ist mittlerweile bekannt, dass Antikörper die mit einer HIT Typ II assoziiert sind, Bindungsstellen auf Thrombozytenproteinen, bezeichnet als Plättchenfaktor 4 (PF4), erkennen, die entstehen, wenn sich PF4 an Heparin oder anderen linearen polyanionischen Verbindung wie z.B. Polyvinyl Sulfanat (PVS) anlagert.<sup>9,10,11</sup>

Die Festphase des PF4 IgG<sup>TM</sup> Enzymimmunoassays wurde mit einem Plättchenfaktor 4 (PF4) - Polyvinyl Sulfanat (PVS) Komplex, als Zielantigen für den Nachweis von IgG-Antikörpern assoziiert mit einer HIT Typ II, beschichtet.

## Testprinzip

Die Patientenprobe wird in die Vertiefungen, die mit einem Plättchenfaktor 4 (PF4) -Polyvinyl-Sulfanat (PVS) Komplex beschichtet sind, pipettiert. Spezifische Antikörper in der Patientenprobe binden an diese Komplexe. Nach einem Waschschrift, bei dem alle nicht gebundenen Antikörper entfernt werden, wird ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Anti-Human IgG zugefügt. In einem weiteren Waschvorgang wird überschüssiges Konjugat entfernt. Durch Zugabe des chromogenen Substrats PNPP entsteht eine Farbreaktion, die nach 30 Minuten mit Stopplösung abgestoppt und photometrisch ausgewertet wird.

## Reagenzien

Maximale Anzahl an Bestimmungen pro Testpackung: 13 (HAT13G) oder 45 (HAT45G)

Lagern Sie die Reagenzien wie auf ihren Labels angegeben.

- |             |  |
|-------------|--|
| <b>MS</b>   | 1. Mikrowells: die Flachbodenvertiefungen der Teststreifen sind beschichtet mit einem Plättchenfaktor 4 (PF4) - Polyvinyl-Sulfanat (PVS) Komplex. Die Teststreifen sind in einem wieder verschließbaren Beutel eingeschweißt. Gebrauchsfertig.   |
| <b>HTCW</b> | 2. PF4-Waschlösungskonzentrat (10 x konzentriert): TRIS-Aminomethan gepufferte Lösung mit Na-Cl <sub>2</sub> und TWEEN 20; enthält 1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit deionisiertem oder destilliertem Wasser verdünnen. Diese Waschlösung kann bis zu 48 Stunden bei Raumtemperatur oder bis zu 7 Tagen bei 2-8°C gelagert werden. |
| <b>HSD</b>  | 3. Probenverdünnungspuffer: Phosphat gepufferte saline Lösung; enthält 0,05% Natrium-Azid. Gebrauchsfertig.  |
| <b>SB</b>   | 4. Substratpuffer: enthält Diethanolamin, MgCl <sub>2</sub> und 0,02% Natrium- Azid. Gebrauchsfertig. Dunkel aufbewahren.  |
| <b>ESS</b>  | 5. Stopplösung: Gebrauchsfertig.   |
| <b>HAG</b>  | 6. Konjugat: ein mit alkalischer Phosphatase markierter gereinigter Antikörper von der Ziege, gerichtet gegen humanes IgG; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.  |

- |            |  |
|------------|--|
| <b>PN</b>  | 7. PNPP (p-Nitrophenylphosphat) Substrat, kristallines Pulver. In destilliertem Wasser auflösen und vor Gebrauch mit Substratpuffer verdünnen. Dunkel aufbewahren, |
| <b>HPC</b> | 8. Positives Kontrollserum: humanes Serum; enthält Rinderalbumin und 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.                        |
| <b>HNC</b> | 9. Negatives Kontrollserum: humanes Serum; enthält 0,1% Natrium-Azid. Vor Gebrauch mit Probenverdünnungspuffer verdünnen.  |
| <b>PS</b>  | 10. Abklebefolien.   |

### **Vorsichtsmaßnahmen**

- Verwenden Sie keine trüben oder kontaminierten Reagenzien.
- Vermeiden Sie jede Kontaminationen des Verdünnungspuffer und des Konjugats. Kontamination dieser Reagenzien mit humanem Serum führt zur Neutralisation des Konjugates und damit zum Testausfall.
- Verwenden Sie keine Reagenzien nach ihrem Verfallsdatum.
- Verwenden Sie weder die Teststreifen noch die Reagenzien aus der Testpackung in Verbindung mit einem anderen Test.
- Verwenden Sie nur die Reagenzien aus der Testpackung bzw. tauschen Sie keine Reagenzien aus, um falsche Ergebnisse auszuschließen.
- Verwerfen Sie nach jedem Testansatz die verdünnten Konjugate, Kontrollen und Substrate.
- Verwenden Sie für die Herstellung der Verdünnungen ausschließlich kalibriertes Material in der entsprechenden Technik.
- Die enzymatische Substratreaktion im letzten Inkubationsschritt ist Temperatur abhängig und sollte bei 22-25°C durchgeführt werden.
- Durch Abweichungen bei den verwendeten Materialien und Geräten und durch Temperaturunterschiede in den Laboratorien kann es sinnvoll sein, die abschließende Inkubationszeit leicht zu erhöhen bzw. zu verringern, um die korrekten Werte für die Kontrollen zu erreichen. Kontrollieren Sie diese Anpassung regelmäßig.

### **Warnhinweis**

- Alle Kontrollen humanen Ursprungs werden auf die Abwesenheit von HIV/HCV/HB<sub>s</sub>-AG mit FDA zugelassenen Testsystemen untersucht. Dennoch sollten alle Materialien als potentiell infektiös behandelt und entsprechend entsorgt werden, da keine Methode eine 100% Sicherheit bietet.
- Einigen Reagenzien ist Natrium-Azid als Konservierungsmittel zugesetzt. Bei Kontakt bitte mit reichlich Wasser spülen. Natrium-Azid ist ein Gift und wirkt im Körper toxisch.
- Entsorgen Sie alle restlichen Packungsbestandteile fachgerecht.

### **Probengewinnung**

Entnehmen Sie das Blut in ACD, Na-Citrat (Plasma) oder ohne Zusatz von Antikoagulantien (Serum) unter den üblichen aseptischen Bedingungen und verwenden Sie es möglichst frisch, um falsch positive oder negative Ergebnisse durch zu lange Lagerung oder Kontamination der Probe auszuschließen. Die Proben können bei 2-8°C bis zu 48 Std. aufbewahrt werden. Bei längerer Lagerung (> 48 Stunden) sollten die Proben aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden. So können diese Proben bis zu 3 Jahren aufgehoben werden. Lagern Sie die Proben nicht in "No-Frost Gefrierschränken"!

Trennen Sie das Serum oder Plasma für die Lagerung oder den Versand von den übrigen Blutbestandteilen.

Partikel oder Ausflockungen in der Probe können zu falsch positiven Ergebnissen oder zu schlechten Doppelbestimmungen führen. Zenrifugieren Sie diese Proben vor ihrer Austestung.

Verwenden Sie ausschließlich humanes Serum oder Plasma für diesen Test. Die Proben dürfen nicht vorverdünnt sein. Dieses führt zu falsch negativen Ergebnissen.

Keine bakteriell verunreinigten, hämolytischen, lipämischen, ikterischen oder Hitze inaktivierten Proben verwenden, um widersprüchliche Ergebnisse zu vermeiden.

**Warnung:** Heparin antikoagulierte Proben dürfen im Test nicht eingesetzt werden.

## Durchführung

### **Mitgelieferte Materialien:**

Die Vials enthalten z.T. mehr Reagenz, als auf dem Label angegeben. Entnehmen Sie deshalb immer die benötigten Menge für die Verdünnungen mit kalibrierten Pipetten.

1. 4 – 1 x 8 Teststreifen in einem Halterahmen (HAT13G) oder  
12 – 1 x 8 Teststreifen in einem Halterahmen (HAT45G)
2. 1 x 50 ml PF4 Waschlösungskonzentrat
3. 1 x 30 ml Probenverdünnungspuffer
4. 1 x 14 ml Substratpuffer
5. 1 x 14 ml Stopplösung
6. 1 x 80 µl Anti-Human IgG Konjugat
7. 4 x 50 mg PNPP Substrat (HAT13G) oder  
6 x 50 mg PNPP Substrat (HAT45G)
8. 1 x 100 µl positives Kontrollserum
9. 1 x 100 µl negatives Kontrollserum
10. Abklebefolien

### **Zusätzlich benötigte Materialien:**

1. Röhrchen für die Verdünnungen der Proben, Kontrollen und Reagenzien
2. Transferpipetten
3. Variable Pipetten: 1 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl und Einwegspitzen
4. Laborwecker
5. ELISA- Reader mit einer Wellenlänge von 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm
6. Deionisiertes oder destilliertes Wasser
7. Papiertücher
8. ELISA-Washer oder Handwaschgerät
9. Zentrifuge
10. Wasserbad bei 37°C oder Brutschrank
11. Heparin, Porcine, USP 10.000 units/ml

### **Testdurchführung**

1. Bringen Sie alle Reagenzien auf Raumtemperatur.
2. Stellen Sie die benötigte Waschlösung her, indem Sie das Waschlösungskonzentrat 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnen und gut mischen.
3. Legen Sie die Anzahl der zu testenden Proben fest. Weisen Sie mit Hilfe des Protokollbogen/Recording Sheet jeder Probe ihre Positionen (2 Vertiefungen je Probe) zu.

### Vorbereitung der Proben und Kontrollen

4. Verdünnen Sie wie angegeben und mischen Sie gut durch:

	Volumen Probenverdünnungspuffer	Volumen Probe
HPC	294 µl	6 µl
HNC	294 µl	6 µl
Patientenprobe	294 µl	6 µl

Hinweis: Die präzisen Volumina der Patientenproben und Kontrollen sind ganz wichtig für genaue Ergebnisse.

5. Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Teststreifen aus der Verpackung und verschließen Sie den Beutel mit den nicht benötigten Streifen sofort nach Entnahme.

Hinweis: Jede Testpackung enthält nur einen Halterahmen. Heben Sie den Rahmen für weitere Tests auf.

Hinweis: Positionieren Sie den Rahmen so, dass die Vertiefung A1 oben links ist. Kontrollieren Sie den richtigen Sitz und das Einrasten der Streifen im Rahmen. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen. Behalten Sie diese Positionierung während der Testdurchführung bei.

6. Geben Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung und lassen Sie alles bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten stehen.
7. Verwerfen Sie den Inhalt und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.
8. Pipettieren Sie 50 µl der verdünnten Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen (siehe Protokollbogen).

Hinweis: Die Blank-Vertiefungen bleiben leer.

Hinweis: Werden pro Testansatz mehrere Patientenproben untersucht, sind die Kontrollen nur einmal erforderlich. Beschriften Sie die Streifen, um Verwechslungen auszuschließen.

9. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
10. Verdünnen Sie das Konjugat 1:100 mit dem Probenverdünnungspuffer in einem Polypropylen-Röhrchen, um Aktivitätsverluste des Konjugates auszuschließen.

Teststreifen:	1 oder 2 – 1 x 8	4 – 1 x 8	12 – 1 x 8
HAG	10 µl	20 µl	60 µl
HSD	1.0 ml	2.0 ml	6.0 ml

Hinweis: Das Konjugat ist sehr viskos. Ziehen Sie es deshalb vorsichtig auf, und mischen Sie es im Probenverdünnungspuffer gut durch.

11. Waschschritte:

- a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- b) Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- d) Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.
- e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Hinweis: Es ist ganz wichtig, dass nach dem letzten Waschschritt alle Flüssigkeitsreste entfernt werden.

12. Geben Sie 50 µl des verdünnten Konjugats in alle Vertiefungen mit Ausnahme der Blanks.
13. Versiegeln Sie die Vertiefungen mit Abklebefolie und inkubieren Sie sie für 30-35 Minuten bei 37°C im Wasserbad oder für 40-45 Minuten im Brutschrank bei 37°C.
14. Lösen Sie das kristalline PNPP-Substrat in 500 µl destilliertem Wasser auf und mischen Sie gut durch, indem Sie den Verschuß wieder einsetzen und das Vial gut schütteln. Bitte bis zur weiteren Verwendung vor Licht schützen.
15. Verdünnen Sie das PNPP 1:100 mit dem Substratpuffer.

Teststreifen:	1 oder 2 – 1 x 8	4 – 1 x 8	12 – 1 x 8
PN	20 µl	40 µl	120 µl
SB	2.0 ml	4.0 ml	12.0 ml

Gut mischen! Vor Licht schützen.

16. Waschschritte:

- a) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus.
- b) Pipettieren Sie 300 µl Waschlösung in jede Vertiefung.
- c) Verwerfen Sie den Inhalt aller Vertiefungen.
- d) Waschen Sie die Vertiefungen 3-4 x wie unter b) und c) beschrieben.

- e) Verwerfen Sie abschließend den Inhalt aller Vertiefungen und klopfen Sie den Rahmen auf einem saugfähigen Papiertuch aus, um alle Flüssigkeitsreste zu entfernen.

Arbeiten Sie die nächsten 3 Schritte genau ab.

17. Geben Sie 100 µl der verdünnten PNPP-Lösung in jede Vertiefung mit Ausnahme der Blanks.

18. Die Reaktionsansätze im Dunkeln exakt 30 Minuten bei Raumtemperatur (22-25°C) inkubieren.

Hinweis: Die Inkubationszeit bzw. -temperatur nach Zugabe des PNPP ist kritisch. Halten Sie sie genau ein und starten Sie die Zeit mit der Zugabe des PNPP in die erste Vertiefung.

19. Geben Sie 100 µl Stopplösung in gleicher Abfolge wie das Substrat in alle Vertiefungen. Geben Sie 200 µl Stopplösung in alle Blankvertiefungen.

20. Die Reaktionen werden nach dem Stoppen im ELISA-Reader bei 405 oder 410 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm ausgewertet. Lassen Sie die Streifen im Dunkeln bis zu max. 30 Minuten stehen, wenn die Auswertung nicht sofort nach dem Abstoppen gemacht werden kann.

21. Ziehen Sie die Blank-OD Werte von den Proben und Kontrollen ab. Bei vielen ELISA-Readern läßt sich dieses programmieren.

22. Übertragen Sie Ihre Werte auf den Protokollbogen /Recording Sheet.

### Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle des PF4 IgG<sup>TM</sup> besteht aus dem Einsatz positiver und negativer Kontrollen, die bei jedem Ansatz mitgeführt werden, um die korrekte Durchführung und die Reaktivität der Reagenzien zu bestätigen.

Kriterien für einen validen Test:

	Negative Kontrolle	Positive Kontrolle
OD Mittelwert	≤ 0.300	≥ 1.800

Die Doppelbestimmungen sollten nicht mehr als 20% vom Mittelwert abweichen. Alle Proben bzw. Kontrollen außerhalb dieses Bereiches sollten wiederholt werden.

Hinweis: Die Gründe für schlechte Doppelbestimmungen können vielfältig sein: Fehler beim Pipettieren der Proben und Reagenzien, Fehler bei den Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, falsche Volumina oder Verschleppungen. Diese führt zu falschen Ergebnissen.

### Interpretation der Testergebnisse

Ein Ergebnis ist positiv, wenn die Extinktion (OD-Wert) der Probe gleich oder größer ist als 0.400 OD.

### **Durchführung des Bestätigungstest einer HIT "Typ II"**

- 1) Verdünnen Sie 1 ml Probenverdünnungspuffer mit 10 µl Heparin in einer Konzentration von 10.000 units/ml zu einer Endkonzentration von 100 units/ml.
- 2) Gehen Sie zurück zu Punkt 4. Verdünnen Sie das Patientenserum und die positive Kontrolle 1:50 mit diesem Puffer-Heparinmisch. Und verdünnen Sie die Proben und Kontrollen auch mit dem Probenverdünnungspuffer aus der Testpackung.
- 3) Rehydrieren Sie Teststreifen wie beschrieben und pipettieren Sie 50 µl jeder Proben- und jeder Kontrollverdünnung in die entsprechenden Vertiefungen.
- 4) Fahren Sie fort mit Punkt 9 der "Testdurchführung".

### **Interpretation des Bestätigungstestes**

Eine Inhibition von mehr als 50% nach Zugabe von Heparin kann als Bestätigung für das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern, die mit PF4:Heparin Komplexen reagieren, betrachtet werden. Auch die positive Kontrolle sollte eine Inhibition zeigen.  
Formel zur Berechnung der %- Inhibition:

$$\left[ (1) - \left( \frac{\text{Probe mit Heparin} - \text{Negative Kontrolle}}{\text{Probe ohne Heparin} - \text{Negative Kontrolle}} \right) \right] \times 100 = \% \text{ Inhibition}$$

Beispiel: die Patientenprobe hat eine Extinktion von 1.000 OD im Standartansatz bei einer negativen Kontrolle von 0.200 OD. Nach Zugabe von Heparin ist die Extinktion der Patientenprobe 0.400 OD. Die %-Inhibition ist 75%.

$$\left[ (1) - \left( \frac{0.400 - 0.200}{1.000 - 0.200} \right) \right] \times 100 = 75\%$$

Eine Inhibition unter 50% ist ein zweifelhaftes Ergebnis und weist auf einen HIT II- Antikörper hin. Ob Heparin in diesem Fall weiter gegeben werden darf, ist nicht geklärt und bedarf weiterer Studien.<sup>12</sup>

### Einschränkungen

Kontaminationen der Reagenzien, falsche Inkubationszeiten bzw. -temperaturen, unzureichendes Waschen und Ausklopfen der Vertiefungen, falsche Volumina, Streulicht bei der Substratinkubation, oder Auslassung von Schritten bei der Abarbeitung führen zu falschen Ergebnissen.

Das Vorhandensein von Immunkomplexen oder anderen Immunglobulin Aggregaten in der Patientenprobe kann zu unspezifischen Bindungen und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Alle Ergebnisse sollten immer mit weiteren serologischen Tests und dem klinischen Bild abgesichert werden.

Schwache Titer oder Antikörper geringer Avidität oder seltener Ausprägung werden u.U. nicht erfaßt und können zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Die in diesem Test verwendeten PF4-PVS Komplexe können leicht von PF4-Heparin Komplexen abweichen. Deshalb ist es möglich, das einige Antikörper mit PVS Komplexen reagieren, nicht aber mit Heparin Komplexen und umgekehrt.

Obwohl ein positives Ergebnis allein mit diesem Test das Vorhandensein von Heparin- induzierten Antikörpern bestätigt, reicht der Nachweis dieser Antikörper jedoch **nicht als Bestätigungstest** für die Diagnose einer HIT Typ II aus.

Einige Patienten haben natürliche PF4-Antikörper.

Proben von Patienten, die Heparin ausgesetzt waren, aber nicht im Rahmen einer Heparin-Therapie, wurden nicht zur Validierung des Tests eingesetzt. Deshalb sollten solche Proben nicht getestet werden.

### Spezifische Charakteristika der Durchführung

#### **Genauigkeit**

Der « within run », « between run » und die Gesamtgenauigkeit des PF4 IgG<sup>TM</sup> Tests wurden bestimmt. Drei Proben mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen wurden hergestellt, indem eine hochtitrige Serumprobe mit negativen Proben gepoolt und verdünnt wurde. Die drei positiven und die negative Probe wurden mit dem PF4 IgG<sup>TM</sup> Test in Doppelbestimmung in 10 Ansätzen getestet. Die Daten wurden mit ANOVA gemäß dem CLSI Dokument EP-5A2 analysiert. Die Berechnungen sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Die Resulte zeigen ≤10% CV für die O.D.-Werte aller Proben. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit dem CLSI Dokument EP12-A. bewertet. Es wurde eine 100% Übereinstimmung zwischen den dokumentierten Ergebnissen « within run » und « between run » für jede getestete Probe gefunden.

Probe	Durchschnittl. O.D.-Wert	Within Run SD	Within Run %cv	Between Run SD	Between Run %cv	Total SD	Total %cv
Negativ	0.090	0.005	5.6%	0.008	8.9%	0.009	10.0%
Schwach Positiv	0.562	0.023	4.1%	0.056	10.0%	0.058	10.3%
Positiv	1.613	0.035	2.2%	0.075	4.7%	0.079	4.9%
Hoch Positiv	2.701	0.069	2.6%	0.092	3.4%	0.092	3.8%

## PF4 IgG<sup>TM</sup> Normalbereich

120 Serumproben wurden von normalen gesunden Individuen entnommen und in Doppelbestimmung im PF4 IgG<sup>TM</sup> Test getestet. Die O.D.-Werte zeigten keine normale Verteilung, deshalb wurde eine nicht-parametrische Analyse benutzt, um den Normalbereich für die O.D.-Werte zu bestimmen (95% reference interval with a 90% confidence). Die Obergrenze des Normalbereichs wurde mit 0.352 O.D.- Einheiten berechnet.

## Methodischer Vergleich: PF4 IgG<sup>TM</sup> gegen PF4 ENHANCED<sup>®</sup> gegen Serotonin Release Assay (SRA).

Es wurden zwei voneinander unabhängige Studien durchgeführt, in denen der PF4 IgG<sup>TM</sup> mit dem PF4 ENHANCED<sup>®</sup> und dem Serotonin Release Assay (SRA) verglichen wurde. Der PF4 ENHANCED<sup>®</sup> ist ein qualitativer ELISA zum Nachweis von IgG, IgA und IgM-Heparin assoziierten Antikörpern. 400 Serumproben wurden getestet (Studie 1 : n=229 Proben; Studie 2 : n= 171 Proben). Die folgenden Tabellen zeigen die Ergebnisse dieser zwei Vergleichsstudien.

		PF4 ENHANCED		
		Positiv	Negativ	Total
PF4 IgG <sup>TM</sup>	Positiv	77	0	77
	Negativ	52	271	323
Total		129	271	400

Übereinstimmung: 87%

Co-Positivität: 60% (95% Confidence Interval = 51.1 – 67.8%)

Co-Negativität: 100% (95% Confidence Interval = 98.6 – 100.0%)

		Serotonin Release Assay		
		Positiv	Negativ	Total
PF4 IgG <sup>TM</sup>	Positiv	41	36	77
	Negativ	4	319	323
Total		45	355	400

Übereinstimmung: 90%

Co-Positivität: 91% (95% Confidence Interval = 79.3 – 96.5%)

Co-Negativität: 90% (95% Confidence Interval = 86.3 – 92.6%)

Von den 4 Proben, die im PF4 IgG<sup>TM</sup> Test negativ und im SRA positiv waren, enthielten 3 Proben IgM oder IgM und IgA-Antikörper, die mit dem PF4 :PVS-Komplex reagierten. Die vierte Probe war im SRA bei Wiederholung in einem anderen Labor negativ.

## Störende Substanzen

Die drei folgenden Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen im PF4 IgG<sup>TM</sup> Test getestet. Die Testung wurde gemäß der CLSI EP7 :Interference Testing in Clinical Chemistry : Approved Guideline durchgeführt. Jede dieser Substanzen wurden zu Proben mit verschiedenen Reaktivitäten von PF4 :Heparin Antikörpern (negativ, schwach positiv, positiv und hoch positiv) gegeben. Die Proben wurden danach im PF4 IgG<sup>TM</sup> Test getestet. Die Ergebnisse wurden mit Kontrollen, denen keine dieser Substanzen zugesetzt waren, verglichen. In allen getesteten Proben konnte kein Effekt dieser Substanzen (< 10% Abweichung der O.D.-Werte der Probe und der Kontrolle) auf die Ergebnisse im PF4 IgG<sup>TM</sup> Test nachgewiesen werden.

Hämoglobin 500 mg/dl  
Triglyceride 500 mg/dl  
Bilirubin 20 mg/dl

## Kreuzreagierende Substanzen

Um mögliche Kreuzreaktionen zwischen dem Zielantigen auf der festen Phase und Antikörpern, die nicht Heparin induzierte Antikörper sind zu bewerten, wurden 68 Proben mit verschiedenen bekannten Antikörpern wie z.B. Thrombozyten Allo- und Autoantikörper, HLA Klasse I Antikörper und RF-Faktor Antikörper getestet. Es ließen sich keine Kreuzreaktionen gegen das immobilisierte Zielantigen auf der Festphase nachweisen.

## Referenzliteratur

1. Visentin GP, Aster RH: Heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2:351-357, 1995.
2. Chong BH: Heparin-induced thrombocytopenia. *Blood Rev* 2:108-114, 1988.
3. Warkentin TE, Chong BH, Greinacher A: Heparin-induced thrombocytopenia: Towards consensus. *Thromb Haemost* 79:1-7, 1998.
4. Chong BH, Burgess J, Ismail F: The clinical usefulness of the platelet aggregation test for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost* 69:344-350, 1993.
5. Sheridan D, Carter C, Kelton JG: A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood* 67:27-30, 1986.
6. Amiral J, Bridey F, Dryfus M, Vissac AM, Fressinaud E, Wolf M, Meyer D: Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia (letter). *Thromb Haemost* 68:95-96, 1992.
7. Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH: Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest* 93:81-88, 1994.
8. Greinacher A, Potzch B, Amiral J, Dummel V, Eichner A, Mueller-Eckhardt C: Heparin-induced thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF-4 heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost* 71:247-251, 1994.
9. Visentin GP, Moghaddam M, Collins JL, McFarland JG, Aster RH: Antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) report conformational changes in platelet factor 4 (PF4) induced by linear, polyanionic compounds. *Blood (Suppl 1)* 90:460a, 1997.
10. Collins JL, Aster RH, Moghaddam M, Piotrowski MA, Strauss TR, McFarland JG: Diagnostic testing for heparin-induced thrombocytopenia (HIT): An enhanced platelet factor 4 complex enzyme linked immunosorbent assay (PF4 ELISA). *Blood (Suppl 1)* 90:461a, 1997.
11. Visentin GP, et. al. Heparin is not required for the detection of antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis. *J. Lab. clin. med.* 138:22-31, July 2001.
12. Aster RH; Unpublished Observations.

## U.S. Patent #5,972,718



**GTi DIAGNOSTICS®**

Good science starts with people.®

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

REF

HAT13G oder HAT45G

Rev. 2010-03-29 (G)



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

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

**PF4 IgG™**

- Zum in-vitro Gebrauch
- Lagerung bei 2-8°C

