

PF4 IgG™

ΕΝΔΕΛΕΙΓΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

PF4 IgG™ είναι μια ποιοτική, μέθοδος ανάλυσης για την ανίχνευση αντισωμάτων IgG σχετιζόμενων με την ηπαρίνη σε ανθρώπινο ορό.

Για *Εργαστηριακή Διαγνωστική Χρήση*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Οι ασθενείς που υπόκεινται σε θεραπεία ηπαρίνης επί τουλάχιστον μια εβδομάδα συχνά αναπτύσσουν θρομβοκυτταροπενία.^{1,2,3} Σε μερικές περιπτώσεις, τα επίπεδα αιμοπεταλίων μειώνονται μόνο ελάχιστα και επανέρχονται στο φυσιολογικό, ακόμα και ενόσω συνεχίζεται η θεραπεία. Αυτός ο τύπος θρομβοκυτταροπενίας ονομάζεται «Τύπος I» ηπαρινοπροκλητή θρομβοκυτταροπενία (HIT) και στην οποία δεν παίζουν διαμεσολαβητικό ρόλο τα αντισώματα.²

Σε άλλους ασθενείς η θρομβοκυτταροπενία είναι σοβαρότερη και σε αυτήν τα αντισώματα παίζουν διαμεσολαβητικό ρόλο. Αυτή η κατάσταση ορίζεται ως «Τύπος II» HIT. Ο Τύπος I HIT θεωρείται εν γένει καλοήθης κατάσταση, ενώ οι ασθενείς με Τύπο II HIT διατρέχουν κίνδυνο να αναπτύξουν σοβαρότερη θρομβοκυτταροπενία καθώς και αρτηριακή ή φλεβική θρόμβωση αν συνεχιστεί η θεραπεία ηπαρίνης. Αντισώματα συσχετιζόμενα με τον Τύπο II HIT μπορούν να ανιχνευθούν με αρκετούς τρόπους. Οι περισσότερο συνηθισμένες τεχνικές είναι η εξέταση της συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων,⁴ η εξέταση απελευθέρωσης σεροτονίνης,⁵ και ο παράγοντας αιμοπεταλίων 4 ELISA.^{6,7,8}

Είναι πλέον γνωστό, ότι τα σχετιζόμενα με τον Τύπο II HIT αντισώματα αναγνωρίζουν τμήματα, σε μια πρωτεΐνη αιμοπεταλίων, η οποία έχει προσδιοριστεί ως «παράγοντας αιμοπεταλίων 4» (PF4), τα οποία δημιουργούνται όταν ο PF4 συμπλέκεται με την ηπαρίνη ή με κάποιο άλλο γραμμικό πολυανιωνικό συστατικό όπως είναι το πολυβινυλικό σουλφίδιο (PVS).^{9,10,11}

Τα μικροβυθίσματα Στερεάς Φάσης PF4 IgG™ παρέχουν ακινητοποιημένα σύμπλοκα PF4:PVS ως στόχο, για την ανίχνευση αντισωμάτων σχετιζόμενων με τον Τύπο II HIT.

ΑΡΧΗ

Το δείγμα του ασθενούς προστίθεται στα βυθίσματα που είναι επιστρωμένα με το σύμπλοκο παράγοντα αιμοπεταλίων (PF4) με PVS. Εάν ένα αναγνωρίζον μία θέση στο PF4:PVS αντίσωμα είναι παρόν, θα δεσμευτεί. Κατόπιν, τα μη δεσμευμένα αντισώματα εκπλένονται. Αντιδραστήριο αλκαλικής φωσφατάσης σημασμένης με αντιανθρώπινη ανοσοφαιρίνη (κατά- IgG) προστίθεται στα βυθίσματα και επωάζεται. Το μη δεσμευμένο κατά- IgG εκπλένεται και προστίθεται το υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση). Μετά από 30 λεπτά επώασης, η αντίδραση διακόπτεται με την προσθήκη Διαλύματος Διακοπής Αντίδρασης. Η οπτική πυκνότητα της αποκτώμενης χρώσης μετράται με φασματοφωτόμετρο.

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Ανώτατος αριθμός αναλύσεων ανά διαγνωστικό σύνολο: 13 (HAT13G) or 45 (HAT45G)

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να αποθηκεύονται όπως αναγράφεται στην ετικέτα.

- | | |
|-------------|--|
| MS | 1. Μικροβυθίσματα: Ταινίες μικροβυθισμάτων επίπεδου πυθμένα στο οποίο υψηλώς κεκαθαρμένος παράγοντας αιμοπεταλίων (PF4) σύμπλοκος με πολυβινυλικό σουλφίδιο (PVS) έχει ακινητοποιηθεί. Τα μικροβυθίσματα εσωκλείονται σε επανασφραγίζομενη θήκη αλουμινίου. Έτοιμα προς χρήση. |
| HTCW | 2. Συμπυκνωμένο (10x) Πλυστικό PF4: Ρυθμιστικό διάλυμα Tris (υδροξυμεθυλ) αμινομεθάνιο περιέχον χλωριούχο νάτριο και Tween 20. 1% νατραζίδιο. Αραιώστε με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό προ χρήσης. Αποθηκεύσατε το Πλυστικό Διάλυμα έως 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου ή έως και επτά μέρες σε θερμοκρασία 2-8°C. |
| HSD | 3. Διαλύτης Δειγμάτων: Ρυθμιστικό Διάλυμα Φωσφορικών. 0.05% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση. |
| SB | 4. Διάλυμα Υποστρώματος: Αυτό το διάλυμα περιέχει διαιθανολαμίνη και χλωριούχο μαγνήσιο. 0.02% νατραζίδιο. Έτοιμο προς χρήση. Προστατέψατε από το Φως. |

ESS	5. Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης: Έτοιμο προς χρήση.
HAG	6. Αντιδραστήριο Συζεύγματος: Σύζευγμα Αλκαλικής φωσφατάσης αιγός με αντίσωμα ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης υψηλώς κεκαθαρμένο (<i>IgG</i>). 0.1% Νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δειγμάτων προ χρήσης.
PN	7. Υπόστρωμα PNPP (p-νιτροφενυλική φωσφατάση): Κρυσταλλική σκόνη. Ανασυστήστε με αποιονισμένο ή αποσταγμένο νερό και αραιώστε στο Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος προ χρήσης.. Προστατέψατε από το Φως.
HPC	8. Θετικός ορός Ελέγχου. Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δειγμάτων προ χρήσης.
HNC	9. Αρνητικός ορός Ελέγχου. Ανθρώπινος ορός. 0.1% νατραζίδιο. Αραιώστε στον Διαλύτη Δειγμάτων προ χρήσης.
PS	10. Μεμβράνες κάλυψης πλακών.

ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

- Μην χρησιμοποιείτε μολυσμένα ή θολά αντιδραστήρια.
- ΕΠΙΒΑΛΛΕΤΑΙ προσοχή προς αποφυγήν μόλυνσης του Διαλύτη Δειγμάτων και του Αντιδραστηρίου Συζεύγματος. Η εξ' αμελείας μόλυνση αυτών των αντιδραστηρίων με ανθρώπινο ορό θα έχει ως αποτέλεσμα την ουδετεροποίηση του Συζεύγματος και ως εκ τούτου, την αποτυχία της ανάλυσης.
- Μην χρησιμοποιείτε αντιδραστήρια πέραν της αναγραφόμενης ημ/ίας λήξης.
- Τα, περιεχόμενα στο διαγνωστικό σύνολο, μικροβυθίσματα και αντιδραστήρια δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται με άλλο σύστημα ανάλυσης.
- Υποκατάσταση των συστατικών με άλλα, από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο, μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα αποτελέσματα.
- Απορρίψατε όποιες ποσότητες αραιωμένου Αντιδραστηρίου Συζεύγματος, αραιωμένου Θετικού και Αρνητικού Ορού Ελέγχου, και αραιωμένου ή ανασυσταμένου αντιδραστηρίου PNPP μετά από κάθε ανάλυση.
- Κατά τις αραιώσεις, ακολουθείστε τις οδηγίες του κατασκευαστή των διανεμητών για τις τεχνικές διανομής και έκπλυσης.
- Η κατά την τελευταία επώαση, αντίδραση ενζυματικού υποστρώματος, είναι ευαίσθητη στην θερμοκρασία και πρέπει να διενεργείται σε ελεγχόμενη περιοχή, σε θερμοκρασία 22-25°C.
- Εξ' αιτίας μεταβολών στα όργανα ή υψηλότερων ή χαμηλότερων θερμοκρασιών δωματίου, συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώνει συγκεκριμένο χρόνο επώασης, ελάχιστα μεγαλύτερο ή μικρότερο, προκειμένου να έχει συνεπή και αξιόπιστα αποτελέσματα των ορών ελέγχου. Επειδή η θερμοκρασία της τελευταίας επώασης ενδέχεται να επηρεάσει τις τιμές των ορών ελέγχου, είναι σημαντικό να ελέγχεται περιοδικά η, σε θερμοκρασία δωματίου, διαδικασία της επώασης.

ΠΡΟΣΟΧΗ

- Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι στους Θετικούς και Αρνητικούς Ορούς Ελέγχου για αυτό το προϊόν ανθρώπινοι οροί, έχουν εξεταστεί και βρεθεί αρνητικοί για αντισώματα κατά HIV, HCV και HbsAg από τις εγκεκριμένες μεθόδους του FDA. Ωστόσο, καμία μέθοδος ελέγχου δεν μπορεί να εγγυηθεί απόλυτα την απουσία του ιού HIV, Ηπατίτιδας C, Ηπατίτιδας B, ή άλλων μολυσματικών παραγόντων. Ως εκ τούτου ο χειρισμός αυτών των υλικών συνιστάται να είναι τέτοιος ως εάν να επρόκειτο για εν δυνάμει μολυσματικό υλικό.
- Κάποια από τα παρεχόμενα σε αυτό το διαγνωστικό σύνολο αντιδραστήρια περιέχουν νατραζίδιο ως συντηρητικό. **ΠΡΟΣΟΧΗ:** Το νατραζίδιο αντιδρά με τον χαλκό και τον μόλυβδο των υδραυλικών σωληνώσεων και σχηματίζει εκρηκτικά μεταλλικά αζίδια. Όταν απορρίπτετε το αντιδραστήριο, περιχύστε το με άφθονο νερό ούτως ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός αζιδίων. Το νατραζίδιο είναι δηλητήριο και τοξικό αν έρθει σε επαφή με το δέρμα ή απορροφηθεί από τις βλεννογόνους μεμβράνες.
- Απορρίψατε όλα τα συστατικά όταν ολοκληρωθεί η ανάλυση σύμφωνα με τους, κατά τόπους, κανονισμούς.

ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Το αίμα πρέπει να συλλέγεται σε ACD, ή κίτρικο νάτριο (πλάσμα) ή χωρίς αντιπηκτικό (ορός) χρησιμοποιώντας ασηπτική τεχνική και πρέπει να εξετάζεται ενόσω είναι φρέσκο ακόμα, προκειμένου να ελαχιστοποιείται η πιθανότητα ψευδώς θετικών ή ψευδώς αρνητικών αντιδράσεων, εξ' αιτίας είτε ακατάλληλης αποθήκευσης είτε μόλυνσης του δείγματος. Τα δείγματα τα οποία δεν μπορούν να εξεταστούν αμέσως, πρέπει είτε να αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 2-8°C όχι περισσότερο από 48 ώρες, είτε να καταψύχονται. Τα δείγματα που καταψύχονται σε θερμοκρασία -20°C ή χαμηλότερη, παραμένουν σε καλή κατάσταση για αρκετό καιρό (2-3 χρόνια). Ωστόσο, προκειμένου να αποφευχθούν οι καταστροφικές επιπτώσεις της επαναλαμβανόμενης κατάψυξης-απόψυξης, συνιστάται η τοποθέτηση των δειγμάτων σε ειδικά φιαλίδια κατάψυξης και η αποθήκευσή τους σε μικρές ποσότητες στην κατάψυξη.

Αποφύγετε την χρήση καταψυκτών χωρίς πάγο.

Ο ορός ή το πλάσμα θα πρέπει να διαχωρίζεται από τα ερυθρά κύτταρα όταν αποθηκεύεται ή αποστέλλεται.

Σωματίδια ή συσσωματώματα στο δείγμα ενδέχεται να προκαλέσουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα ή λανθασμένες τιμές στις επαναληπτικές εξετάσεις. Τα περιέχοντα σωματίδια δείγματα πρέπει να καθαρίζονται με φυγοκέντριση προ της ανάλυσης.

Μόνο ολικός ανθρώπινος ορός ή πλάσμα είναι κατάλληλα για αυτή την ανάλυση. Προηγούμενη αραιώση των δειγμάτων με οτιδήποτε άλλο από φυσιολογικό αρνητικό ανθρώπινο ορό ELISA, θα μπορούσε να επηρεάσει τα αποτελέσματα.

Αποφύγετε την χρήση μικροβιακά μολυσμένων, λιπαιμικών, ικτερικών, ή αδρανοποιημένων με θέρμανση δειγμάτων, διότι μπορεί να προκύψουν μη συνεπή αποτελέσματα.

ΠΡΟΣΟΧΗ: Δείγματα που έχουν επεξεργαστεί με ηπαρίνη δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν σε αυτή την ανάλυση.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Παρεχόμενα Υλικά:

Τα φιαλίδια ενδεχομένως να περιέχουν περισσότερο αντιδραστήριο από το περιγραφόμενο στις ετικέτες. Βεβαιωθείτε ότι μετράτε το αντιδραστήριο με μια κατάλληλη συσκευή κατά την αραιώση.

1. 4 – 1 x 8 Ταινίες Μικροβυθισμάτων με βάση στήριξης (HAT13G) ή
12 – 1 x 8 Ταινίες Μικροβυθισμάτων με βάση στήριξης (HAT45G)
2. 1 x 50 mL Συμπυκνωμένο Πλυστικό
3. 1 x 30 mL Διαλύτη Δειγμάτων
4. 1 x 14 mL Διάλυμα Υποστρώματος
5. 1 x 14 mL Διάλυμα Διακοπής Αντίδρασης
6. 1 x 80 μL Αντιδραστηρίου Συζεύγματος Αντιανθρώπινης IgG
7. 4 x 50 mg PNPP Υπόστρωμα (HAT13G) ή
6 x 50 mg PNPP Υπόστρωμα (HAT45G)
8. 1 x 100 μL Θετικός ορός ελέγχου
9. 1 x 100 μL Αρνητικός ορός ελέγχου
10. Ταινίες σφράγισης Πλακών

Πρόσθετα Απαιτούμενα Υλικά:

1. Δοκιμαστικοί σωλήνες για τα δείγματα ασθενών και αραιώσεις ορών ελέγχου και αντιδραστηρίων
2. Πιπέττες μεταφοράς
3. Ρυθμιζόμενες μικροπιπέττες διανομής 1 – 10 μL, 10 – 100 μL, και 100 – 1,000 μL και ρύγχη μιας χρήσης
4. Χρονόμετρο
5. Συσκευή ανάγνωσης μικροπλάκας ικανή να μετρά ΟΠ σε 405 ή 410 και 490 nm
6. Απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό
7. Απορροφητικές πετσέτες χαρτιού
8. Συσκευή πλύσης μικροπλάκας
9. Συσκευή φυγοκέντρισης για τον διαχωρισμό του ορού ή του πλάσματος των δειγμάτων των ασθενών.
10. Συσκευή επώασης ή υδατόλουτρο 37°C

11. Χοίρειος Ηπαρίνη, USP 10,000 μονάδες/mL

Διαδικασία Ανάλυσης

1. Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια να έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου.
2. Φτιάξτε το διάλυμα Πλυστικού, αραιώνοντας το. Προσθέστε 1 όγκο Συμπυκνωμένου Πλυστικού σε 9 Όγκους απιονισμένου ή αποσταγμένου νερού. Αναμείξτε καλά.
3. Καθορίστε τον αριθμό των, προς εξέταση, δειγμάτων των ασθενών. Χρησιμοποιείτε το Φύλλο Καταγραφής για να προσδιορίσετε την θέση κάθε δείγματος αποτελούμενη από δύο (εις διπλούν) βυθίσματα. Καταγράψτε την ταυτότητα κάθε δείγματος στο Φύλλο Καταγραφής.

ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΟΡΩΝ ΕΛΕΓΧΟΥ

4. Αραιώστε ως ακολούθως και αναμείξτε καλά:

	Όγκο Διαλύτη Δειγμάτων	Όγκο Δείγματος
HPC	294 μ L	6 μ L
HNC	294 μ L	6 μ L
Δείγμα Ασθενούς	294 μ L	6 μ L

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Για την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, είναι σημαντική η ακριβής μέτρηση των δειγμάτων και των ορών ελέγχου των ασθενών.

5. Αφαιρέστε το πλαίσιο των μικροβυθισμάτων **από** τη θήκη. Αμέσως αφαιρέστε και επανασφραγίστε τις ταινίες που δεν χρειάζονται, στην προστατευτική θήκη.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Στο διαγνωστικό σύνολο παρέχεται μόνο ένα πλαίσιο. Μην το πετάτε έως ότου, έχουν χρησιμοποιηθεί όλες οι ταινίες.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Προσανατολίστε τα βοθρία με το A1 στην άνω αριστερή γωνία. Βεβαιωθείτε πως όλα τα βοθρία είναι σωστά τοποθετημένα και βαθιά στις εγκοπές τους. Αριθμείστε κάθε σειρά για να αποφύγετε λάθη. Διατηρείστε την ίδια κατεύθυνση στην μικροπλάκα σε όλη την διάρκεια της εξέτασης.

6. Προσθέσατε 300 μ L του Πλυστικού διαλύματος στα προκαθορισμένα βυθίσματα. και αφήστε τα σε θερμοκρασία δωματίου επί 5-10 λεπτά.
7. Αναρροφείστε το υγρό δυνατά και αναποδογυρίστε σε απορροφητικό χαρτί προς αποφυγή αφύγρανσης.
8. Προσθέστε 50 μ L του κατάλληλου αραιωμένου ορού ελέγχου ή δείγματος στα βυθίσματα όπως έχει καθοριστεί στο Φύλλο Καταγραφής.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Μην προσθέτετε δείγματα ή αντιδραστήρια σε τυφλά βυθίσματα.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Αν εξετάζονται πολλαπλά δείγματα ασθενών ταυτόχρονα, μόνο ένα σετ ορών ελέγχου απαιτείται.
ΤΟΠΟΘΕΤΗΣΤΕ ΕΤΙΚΕΤΕΣ ΣΕ ΚΑΘΕ ΤΑΙΝΙΑ ΠΡΟΣ ΑΠΟΦΥΓΗ ΛΑΘΩΝ.

9. Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία κάλυψης πλακών και επώαστε για 30-35 λεπτά σε υδατόλουτρο 37°C. Εάν χρησιμοποιηθεί ξηρό επωαστικό, αυξήσατε τον χρόνο επώασης κατά 10 λεπτά.
10. Αραιώστε το Αντιδραστήριο Συζεύγματος με τον Διαλύτη Δείγματος με αναλογία 1 προς 100. Χρησιμοποιείτε δοχείο πολυπροπυλενίου.

Ταινίες:	1 ή 2 – 1 x 8	4 – 1 x 8	12 – 1 x 8
HAG	10 μ L	20 μ L	60 μ L
HSD	1.0 mL	2.0 mL	6.0 mL

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Το Αντιδραστήριο Συζεύγματος είναι ιξώδες. Εμβαπτίστε το ρύγχος στο Αντιδραστήριο Συζεύγματος πριν την διανομή και ξεβγάλατε μετά την πρόσθεση στον Διαλύτη Δείγματος. Ανακατέψτε καλά.

11. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 300 μL , Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 ή 4 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Είναι σημαντικό να αφαιρέσετε τελείως όλο το πλυστικό διάλυμα μετά την τελευταία πλύση.

- Προσθέσατε 50 μL αραιωμένου Αντιδραστηρίου Συζεύγματος (όπως αυτή έγινε σε προηγούμενο στάδιο) σε όλα τα βυθίσματα ΕΚΤΟΣ από αυτά που έχουν χαρακτηριστεί ως ΤΥΦΛΑ.
- Σφραγίστε τα μικροβυθίσματα με ταινία σφράγισης πλάκας και επώαστε επί 30-35 λεπτά σε μπάνιο 37°C. Αν χρησιμοποιείται ξηρό επωαστήριο, αυξήστε τον χρόνο κατά 10 λεπτά.
- Αραιώστε το Υπόστρωμα PNPP προσθέτοντας 0.5 mL αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό στο φιαλίδιο. Επανατοποθετείστε το Διάλυμα Διακοπής της Αντίδρασης (stopper), και ανακατέψτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση.
- Αραιώστε το PNPP με το Ρυθμιστικό Διάλυμα Υποστρώματος σε αναλογία 1 προς 100.

Ταινίες	1 ή 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

Αναμείξτε καλά. Προστατέψτε από το φως, έως την χρήση.

16. ΠΛΥΣΙΜΟ:

- Αναρροφήσατε τα περιεχόμενα κάθε βυθίσματος και αφυγράνετε σε απορροφητικό χαρτί.
- Προσθέστε 300 μL , Πλυστικού Διαλύματος.
- Αναρροφήσατε ή αφαιρέστε το υγρό.
- Επαναλάβετε τα βήματα b + c επί συνολικά 3 ή 4 πλυσίματα.
- Αφαιρέστε απότομα το υγρό για να αφαιρεθούν τα υπολείμματα του πλυστικού διαλύματος. Αναστρέψατε σε απορροφητικό χαρτί για να εμποδίσετε την αφύγρανση.

Προχωρείστε γρήγορα στα επόμενα 3 βήματα.

- Προσθέστετε 100 μL του αραιωμένου διαλύματος PNPP σε όλα τα βυθίσματα ΕΚΤΟΣ αυτών που έχουν χαρακτηριστεί ως ΤΥΦΛΑ.
- Αφήστε τα μικροβυθίσματα να σταθούν στο σκοτάδι επί 30 λεπτά σε ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΔΩΜΑΤΙΟΥ (22-25°C).

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Ο χρόνος επώασης και η θερμοκρασία μετά την πρόσθεση του PNPP είναι κρίσιμα. ΜΗΝ τροποποιήσετε τους προκαθορισμένους χρόνους επώασης και την θερμοκρασία. Για λόγους διατήρησης σταθερότητας, ξεκινήστε την χρονομέτρηση αμέσως μετά την πρόσθεση του αντιδραστηρίου στο πρώτο βύθισμα.

- Διακόψτε την αντίδραση προσθέτοντας 100 μL Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης σε κάθε βύθισμα με την ίδια σειρά με την οποία προσετέθη το υπόστρωμα. Προσθέστε 200 μL Διαλύματος Διακοπής της Αντίδρασης στα τυφλά βυθίσματα.
- Διαβάστε την απορρόφηση (OD) κάθε βυθίσματος στα 405 ή 410 nm χρησιμοποιώντας φίλτρο αναφοράς 490 nm. Εάν τα αποτελέσματα δεν μπορούν να διαβαστούν αμέσως επιστρέψτε τα βυθίσματα σε σκοτεινό μέρος και αφήστε τα να μείνουν έως και 30 λεπτά.

21. Αφαιρέστε τις αποκτηθείσες τιμές από τα τυφλά βυθίσματα από όλα τα βυθίσματα δειγμάτων και ορών ελέγχου. Πολλά φωτόμετρα ELISA είναι προγραμματισμένα να διεκπεραιώνουν αυτό το στάδιο αυτόματα.
22. Καταγράψτε τα αποτελέσματα στο Φύλλο Καταγραφής Αποτελεσμάτων.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Ο ποιοτικός έλεγχος του PF4 IgG™ είναι ενσωματωμένος στο σύστημα ανάλυσης με την συμπερίληψη των Αρνητικού και Θετικού Ορών Ελέγχου. Αυτοί οι οροί ελέγχου πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε τεστ εξέταση προκειμένου να προσδιορίζονται τυχόν τεχνικά λάθη και λάθη αντιδραστηρίων.

Κριτήρια αξιόπιστης εξέτασης:

	Αρνητικό ορό Ελέγχου	Θετικό ορό Ελέγχου
Μέσος όρος OD (ΟΠ= Οπτική Πυκνότητα)	≤ 0.300	≥ 1.800

Οι αποκτηθείσες, από διπλές αναλύσεις, τιμές ΟΠ θα πρέπει να εμπίπτουν μέσα στο 20% του μέσου όρου των δύο τιμών. Τα δείγματα, των οποίων τα αποτελέσματα βρίσκονται έξω από αυτό το όριο, πρέπει να επανεξετασθούν.

ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ: Η κακή επαναληψιμότητα των διπλών μπορεί να είναι αποτέλεσμα παράλειψης του αντιδραστηρίου ή του δείγματος, άνιση πρόσθεση αντιδραστηρίων, άνισες θερμοκρασίες κατά την επώαση, απ' ευθείας έκθεση στο φως κατά την τελευταία επώαση ή διασταυρούμενη επιμόλυνση. Η αποτυχία να γίνει η εξέταση εις διπλούν, ενδεχομένως να οδηγήσει στην αποδοχή λανθασμένων αποτελεσμάτων.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα των εξετάσεων με τιμές ΟΠ ίσες ή μεγαλύτερες από 0.400 OD θεωρούνται θετικά.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΓΙΑ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΗΠΑΡΙΝΗ

- 1) Σε 1 mL του Διαλύτη Δειγμάτων προσθέστε 10 µL ηπαρίνης (10,000 units/mL) σε τελική συγκέντρωση 100 Μονάδες ανά mL.
- 2) Επιστρέψτε στο βήμα 4 ανωτέρω. Αραιώστε τα δείγματα των ασθενών και τον θετικό ορό ελέγχου στον περιέχοντα περίσσεια ηπαρίνης Διαλύτη Δειγμάτων. Επίσης αραιώστε τα δείγματα των ασθενών, τον αρνητικό και θετικό ορό ελέγχου, στον συμπεριλαμβανόμενο στο διαγνωστικό σύνολο, Διαλύτη Δειγμάτων.
- 3) Ενυδατώστε εκ νέου, ταινίες όπως προηγουμένως. Προσθέστε 50 µL δειγμάτων που έχουν διατηρηθεί σε κατάψυξη (aliquots) κάθε ασθενούς, και αραιώσεις ορών ελέγχου, σε βυθίσματα εις διπλούν.
- 4) Διενεργείστε την εξέταση, όπως περιγράφεται στην «Διαδικασία Εξέτασης η οποία ξεκινά με το βήμα 9.

ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

Η Αναστολή θετικής αντίδρασης κατά 50% ή περισσότερο, παρουσία περίσσειας ηπαρίνης θεωρείται επικυρωτική για την παρουσία ειδικών αντισωμάτων που αντιδρούν με PF4:ηπαρίνη. Ο θετικός ορός ελέγχου θα πρέπει επίσης να δείξει Αναστολή. Ο τύπος προσδιορισμού της % Αναστολής είναι:

$$\left[(1) - \left(\frac{\text{Ορός ασθενούς με Ηπαρίνη} - \text{Αρνητικός Ορός Ελέγχου}}{\text{Ορός ασθενούς χωρίς Ηπαρίνη} - \text{Αρνητικός Ορός Ελέγχου}} \right) \right] \times 100 = \% \text{ Αναστολή}$$

Παράδειγμα: Ο ορός ασθενούς δίνει τιμή O.D 1.000 στην τυπική εξέταση με αρνητική τιμή ορού ελέγχου 0.200. Με περίσσεια ηπαρίνης, ο ορός του ασθενούς δίνει τιμή Οπτικής Πυκνότητας (O.D.) 0.400. Το ποσοστό επί τοις εκατό της Αναστολής είναι:

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

Η Αναστολή μιας θετικής αντίδρασης κατά λιγότερο από 50% αποτελεί ένα διφορούμενο αποτέλεσμα. Αυτός ο τύπος αντίδρασης δίνεται από ένα μικρό ποσοστό αντισωμάτων σε ασθενείς που είναι ύποπτοι για Τύπο II HIT. Η σημαντικότητά

αυτού του τύπου της αντίδρασης δεν έχει ακόμα καθιερωθεί. Δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί το αν, η εκ νέου χορήγηση ηπαρίνης σε ασθενείς, των οποίων ο ορός δίνει διαφορούμενο αποτέλεσμα, είναι ασφαλής.¹²

ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

Τα λανθασμένα αποτελέσματα μπορεί να προκύψουν από βακτηριακή μόλυνση των υλικών της εξέτασης, ανεπαρκείς χρόνους επώασης, ανεπαρκείς ή πλημμελείς πλύσεις των υπό εξέταση βυθισμάτων, έκθεση του υποστρώματος σε απ' ευθείας φως, έκθεση σε υψηλότερες ή χαμηλότερες από τις συνιστώμενες θερμοκρασίες, ή παράλειψη κάποιου σταδίου.

Η παρουσία ανοσοσυμπλεγμάτων ή συσσωματωμάτων ανοσοσφαιρίνης στο δείγμα του ασθενούς, ενδέχεται να προκαλέσει αυξημένη μη-ειδική δέσμευση και να παράξει ψευδώς θετικά στην ανάλυση.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως η μόνη βάση μιας κλινικής απόφασης.

Κάποιοι χαμηλοί τίτλοι, χαμηλής ζωτικότητας αντισώματα μπορεί να μην είναι ανιχνεύσιμα με την χρήση αυτής της ανάλυσης.

Τα χρησιμοποιούμενα σε αυτήν την ανάλυση, συμπλέγματα PF4:PVS, μπορεί να διαφέρουν ελάχιστα από αυτά που σχηματίζονται από τον PF4:ηπαρίνη. Ως εκ τούτου, είναι πιθανό μερικά αντιγόνα να αντιδρούν με συμπλέγματα PVS τα οποία δεν αντιδρούν με συμπλέγματα ηπαρίνης και αντίστροφα.

Παρ' ότι η, αποκτούμενη με αυτή την ανάλυση, θετική αντίδραση μπορεί να αποτελεί ένδειξη παρουσίας αντισώματος σχετιζόμενου με ηπαρίνη, η ανίχνευση τέτοιων αντισωμάτων, ΔΕΝ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΝΕΙ την διάγνωση ηπαρινοπροκλητής θρομβοκυτταροπενίας.

Μερικοί ασθενείς μπορεί να φέρουν, από τη φύση τους, αντισώματα κατά PF4.

Για την αξιολόγηση αυτού του προϊόντος, δεν χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ασθενών που εξετέθησαν σε ηπαρίνη αλλά οι οποίοι δεν υπεβλήθησαν σε θεραπεία ηπαρίνης. Ως εκ τούτου, δεν θα έπρεπε να εξετάζονται δείγματα ασθενών, άλλων, εκτός όσων υποβάλλονται σε θεραπεία ηπαρίνης.

ΕΙΔΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΛΟΣΗΣ

Ακρίβεια

Η ακρίβεια εντός της παρτίδας, η ακρίβεια από παρτίδα σε παρτίδα και η συνολική ανακρίβεια της μεθόδου PF4 IgGTM προσδιορίστηκαν. Τρία δείγματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις αντισωμάτων προετοιμάστηκαν αραιώνοντας ένα δείγμα ορού με υψηλό επίπεδο αντισωμάτων αντί-PF4 :PVS μέσα σε σύνολο ανθρώπινων ορών που δεν περιείχαν αντί-PF4 :PVS αντισώματα. Τα τρία θετικά δείγματα και ένα αρνητικό δείγμα ελέγχθηκαν διπλά σε 10 διαφορετικές παρτίδες με τη μέθοδο PF4 IgGTM. Για να πάρουμε την ανακρίβεια των O.D. τιμών, τα δεδομένα αναλύθηκαν από την ANOVA σύμφωνα με το CLSI Έγγραφο EP-5A2. Οι υπολογισμοί παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζουν $\leq 10\%$ CV για τις OD τιμές όλων των δειγμάτων. Επιπρόσθετα, τα παρουσιαζόμενα αποτελέσματα αναλύθηκαν σύμφωνα με το CLSI Έγγραφο EP12-A. Υπήρξε 100% συμφωνία στα παρουσιαζόμενα αποτελέσματα εντός της παρτίδας και από παρτίδα σε παρτίδα για κάθε ελεγχόμενο δείγμα.

Δείγμα	Μέση Τιμή O.D.	Ακρίβεια Εντός της παρτίδας SD	Ακρίβεια Εντός της παρτίδας %cv	Ακρίβεια από Παρτίδα σε Παρτίδα SD	Ακρίβεια από Παρτίδα σε Παρτίδα %cv	Σύνολο SD	Σύνολο %cv
Αρνητικό	0.090	0.005	5.6%	0.008	8.9%	0.009	10.0%
Οριακά Θετικό	0.562	0.023	4.1%	0.056	10.0%	0.058	10.3%
Ενδιάμεσα Θετικό	1.613	0.035	2.2%	0.075	4.7%	0.079	4.9%
Ανώτερο Θετικό	2.701	0.069	2.6%	0.092	3.4%	0.092	3.8%

PF4 IgGTM Φυσιολογικές Τιμές

Εκατόν είκοσι οροί από φυσιολογικούς υγιείς δότες ελέγχθηκαν (εις διπλούν) με το διαγνωστικό σύνολο PF4 IgGTM. Οι τιμές O.D. δεν παρουσιάζουν κανονική κατανομή και γι' αυτό το λόγο μια μη- παραμετροποιημένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε για να

αποφασιστεί η κατανομή του φυσιολογικού εύρους τιμών (95% διάστημα εμπιστοσύνης με 90% εμπιστοσύνη). Το άνω άκρο του εύρους υπολογίστηκε σε 0.352 μονάδες O.D.

Σύγκριση Μεθόδων: Σύγκριση του PF4 IgGTM με τη Δοκιμασία Αποδέσμευσης Σεροτονίνης (SRA)

Δυο ανεξάρτητες μελέτες σχεδιάστηκαν στις οποίες το πρωτόκολλο PF4 IgGTM συγκρίθηκε τόσο με το PF4 ENHANCED[®] όσο και με την δοκιμασία Αποδέσμευσης Σεροτονίνης (SRA). Η μέθοδος PF4 ENHANCED[®] είναι ποσοτική ELISA για την ανίχνευση IgG, IgA, και IgM αντισωμάτων σχετιζόμενων με ηπαρίνη. Συνολικά 400 δείγματα ορών εξετάστηκαν (Site 1; n = 229 δείγματα, Site 2; n = 171 δείγματα). Οι κάτωθι πίνακες δείχνουν την ανάλυση της μεθόδου σύγκρισης για τα συνολικά αποτελέσματα και των δύο μελετών.

		PF4 ENHANCED [®]		Σύνολο
		Θετικό	Αρνητικό	
PF4 IgG TM	Θετικό	77	0	77
	Αρνητικό	52	271	323
	Σύνολο	129	271	400

Συμφωνία: 87%

Συν-θετικότητα: 60% (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης = 51,1 – 67,8%)

Συν-αρνητικότητα: 100% (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης = 98,6 – 100%)

Δοκιμασία Αποδέσμευσης Σεροτονίνης

PF4 IgG TM		Θετικό	Αρνητικό	Σύνολο
		Θετικό	41	36
Αρνητικό	4	319	323	
Σύνολο	45	355	400	

Συμφωνία: 90%

Συν-θετικότητα: 91% (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης = 79,3 – 96,5%)

Συν-αρνητικότητα: 90% (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης = 86,3 – 92,6%)

Από τα 4 δείγματα που ήταν αρνητικά στο πρωτόκολλο PF4 IgGTM και θετικά στο SRA, τρία από αυτά τα δείγματα βρέθηκαν να περιέχουν IgM ή IgM και IgA αντισώματα αντιδρώντα με το σύμπλοκο PF4:PVS. Το άλλο δείγμα που απομένει βρέθηκε αρνητικό στην SRA όταν ελέγχθηκε για την SRA σε άλλο εργαστήριο.

Διασταυρούμενες Ουσίες

Οι παρακάτω ενδογενείς ουσίες ελέγχθηκαν στο πρωτόκολλο PF4 IgGTM στην συγκέντρωση που αναφέρεται. Ο έλεγχος έγινε σύμφωνα με την μέθοδο CLSI EP7: Interference Testing in Clinical Chemistry: Approved Guideline. Κάθε ουσία εισήχθη σε δείγματα που περιείχαν διαφορετικές αντιδραστικότητες σε PF4: αρνητικά για ηπαρηνικά αντισώματα (αρνητικά, χαμηλά, μεσαία, και υψηλά θετικά). Τα δείγματα ελέγχθηκαν μετά με το πρωτόκολλο PF4 IgGTM. Τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά του ορού ελέγχου όπου δεν υπήρχαν ουσίες παρεμβολής. Για όλα τα δείγματα που ελέγχθηκαν, οι ουσίες δεν είχαν σημαντική επίδραση (< 10% διαφορά σε O.D. τιμές μεταξύ δείγματος και ορού ελέγχου).

Αιμοσφαιρίνη 500 mg/dL
Τριγλυκερίδια 500 mg/dL
Bilirubin 20 mg/dL

Διασταυρούμενες Ουσίες

Προκειμένου να προσδιοριστεί η πιθανή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα μεταξύ του αντιγόνου στόχου και αντισωμάτων άλλων εκτός των σχετιζόμενων με ηπαρίνη, αντισωμάτων, 68 δείγματα περιέχοντα ποικιλία αντισωμάτων μεταξύ των οποίων, γνωστά αντισώματα κατά αλλοαντιγόνων αιμοπεταλίων, αυτοαντισώματα αιμοπεταλίων, αντισώματα κατά HLA τάξης I, και αντιρευματοειδή παράγοντα, εξετάστηκαν με αυτή την ανάλυση, και κανένα δεν είχε διασταυρούμενη αντίδραση με το, ακινητοποιημένο στα μικροβυθίσματα, αντιγόνο στόχου.

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

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



PF4 IgG™

- ΓΙΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ
- ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΣΕ 2-8°C

GTi DIAGNOSTICS®

Good science starts with people.®

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

REF

HAT13G ή HAT45G

Αναθεωρήθηκε: 2010-03-29 (Gr)

EC REP

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

