

PF4 IgG™

PROPÓSITO DE EMPLEO

PF4 IgG™ es un ensayo cualitativo de rastreo para la detección de anticuerpos IgG asociados a heparina en suero humano.

Para Uso en Diagnóstico *In Vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los pacientes que reciben tratamiento con heparina durante al menos una semana a menudo desarrollan trombocitopenia.^{1,2,3} En algunos casos los niveles de plaquetas se reducen sólo ligeramente y retornan a niveles normales incluso al continuar con el tratamiento de heparina. Este tipo de trombocitopenia se denomina Trombocitopenia inducida por heparina (HIT) “Tipo I” y no está mediada por anticuerpos.²

En otros pacientes la trombocitopenia es normalmente más severa y está mediada por anticuerpos. Esta condición se denomina HIT “Tipo II”. El Tipo I es considerado de forma habitual como benigno, en cambio los pacientes con HIT Tipo II tienen el riesgo de desarrollar trombocitopenia más severa así como trombosis arterial o venosa si se continúa con la terapia con heparina. Los anticuerpos asociados con el HIT Tipo II se pueden detectar de varias formas. Las técnicas más usadas comúnmente son los test de agregación plaquetaria,⁴ el test de liberación de serotonina,⁵ y el ELISA factor 4 plaquetario.^{6,7,8}

Actualmente se sabe que los anticuerpos asociados al HIT Tipo II reconocen sitios en las proteínas plaquetarias designados como “factor 4 plaquetario” (PF4) que son creados cuando el PF4 forma un complejo con heparina u otro compuesto polianiónico lineal como pueda ser el Polivinilsulfonato (PVS).^{9,10,11}

El ELISA PF4 IgG™ de fase sólida contiene micropocillos con complejos PF4:PVS inmovilizados para la detección de anticuerpos IgG asociados al HIT Tipo II.

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Se añade suero de paciente a los micropocillos tapizados con factor 4 plaquetario (PF4) combinado con Polivinilsulfonato (PVS). Si un anticuerpo que reconoce un sitio en el complejo PF4:PVS está presente, se producirá una unión. Los anticuerpos no unidos se eliminan por lavado. A continuación, se añade a los pocillos un reactivo anti-inmunoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina (Anti-IgG) y se incuba. La Anti-IgG no ligada se elimina por lavado y el substrato PNPP (p-nitrofenilfosfato) es añadido. 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 tests por kit: 13 (HAT13G) o 45 (HAT45G)

Los reactivos deben conservarse según las especificaciones de su etiqueta.

- | | |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MS | 1. Micropocillos: tiras de micropocillos de fondo plano tapizado con factor 4 plaquetario purificado por afinidad (PF4) unido a polivinilsulfonato (PVS). Estas tiras de micropocillos están incluidas dentro de una bolsa sellada. Listas para su uso. |
| HTCW | 2. Solución Concentrada de Lavado PF4 (10X): Solución tamponada Tris (hidroximetil) aminometano que contiene cloruro sódico y Tween 20.1% azida sódica. Diluir con agua desionizada o destilada antes de su uso. Almacenar esta Solución de Lavado resultante hasta un máximo de 48 horas a temperatura ambiente o hasta un máximo de siete días entre 2 y 8°C. |
| HSD | 3. Diluyente de Muestra: Solución salina tamponada de Fosfato. 0.05% azida sódica. Lista para su uso. |
| SB | 4. Tampón Substrato: Esta solución contiene dietanolamina y cloruro magnésico. 0.02% azida sódica. Listo para su uso. Proteger de la luz. |
| SS | 5. Solución de Paro: Hidróxido Sódico 3 M. Listo para su uso. Manipular con cuidado. |

- | | |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HAG | 6. Conjugado: Anticuerpo de cabra anti inmunoglobulina humana (IgG) purificado por afinidad y conjugado con fosfatasa alcalina. 0.1% azida sódica. Diluir con Diluyente de Muestra antes de su uso. |
| PN | 7. Substrato PNPP (p-nitrofenilfosfato): Polvo cristalino. Reconstituir con agua desionizada o destilada y diluir en Tampón de Substrato antes de su uso. Proteger de la luz. |
| HPC | 8. Suero Control Positivo: Suero humano que contiene albúmina bovina. 0.1% azida sódica. Diluir en Diluyente de Muestra antes de usar. |
| HNC | 9. Suero Control Negativo: Suero humano. 0.1% azida sódica. Diluir en Diluyente de Muestra antes de usar. |
| PS | 10. Láminas adhesivas de sellado. |

PRECAUCIONES

- No utilizar reactivos que estén turbios o contaminados.
- SE DEBE llevar cuidado para evitar una posible contaminación del Diluyente de Muestra y del Conjugado. La contaminación inadvertida de estos reactivos con suero humano provocaría la neutralización del Conjugado y, por consiguiente, el fracaso de la prueba.
- No usar reactivos después de su fecha de caducidad.
- Los micropocillos 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.
- A la hora de hacer las diluciones, seguir las instrucciones del fabricante de las pipetas para una correcta aspiración y dispensación de los reactivos.
- La reacción enzima-substrato que tiene lugar en la última incubación es sensible a la temperatura y debería realizarse en un área controlada, a una temperatura 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 de manera constante resultados control válidos. Es importante monitorizar periódicamente la temperatura de la habitación ya que ésta puede afectar los valores control en la incubación final.

CUIDADO

- Todos los sueros humanos utilizados en los controles Positivo y Negativo para este producto han sido testados y encontrados negativos para los anticuerpos contra HIV, HCV y HBsAg mediante métodos aprobados por la FDA. No obstante, ninguna prueba puede ofrecer una completa seguridad de ausencia de virus 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 altamente explosivas. Cuando se deseche en el fregadero deberá enjuagarse con gran cantidad de agua para prevenir una acumulación 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 sin anticoagulante utilizando una técnica aséptica y debería analizarse estando todavía fresca para minimizar la posibilidad de obtener reacciones de falsos positivos o falsos negativos debidas a un incorrecto almacenaje o contaminación de la muestra. Las muestras que no puedan analizarse de forma inmediata deberían almacenarse a una temperatura de entre 2° y 8°C durante un máximo de 48 horas o bien ser congeladas. Las muestras congeladas a -20°C o a una temperatura inferior, permanecen en buenas condiciones durante varios años (2-3 años). Sin embargo, con el fin de evitar el efecto nocivo de repetidos ciclos de congelación/descongelación, se recomienda alicuotar las muestras en pequeños volúmenes y entonces almacenar congeladas estas alícuotas. Evitar los congeladores antiescarcha.

El suero debe ser separado de las células rojas antes de su almacenamiento o transporte.

Las partículas o agregados en la muestra pueden provocar falsos positivos o poca repetibilidad. Las muestras que contengan partículas deberán aclararse por centrifugación previamente a su análisis.

Para este test solo puede usarse suero humano completo. La dilución previa de las muestras en cualquier forma no normal, suero humano negativo ELISA podría afectar al resultado.

Las muestras de suero contaminadas microbiológicamente, hemolizadas, lipémicas, ictericas o inactivadas por calor pueden dar resultados inconsistentes y deberían ser evitadas.

ATENCIÓN: No deben emplearse en este test muestras anticoaguladas con heparina.

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. 4 - 1 x 8 Tiras de miropocillos con soporte (HAT13G) o
12 - 1 x 8 Tiras de miropocillos con soporte (HAT45G)
2. 1 x 50 mL Solución Concentrada de Lavado PF4
3. 1 x 30 mL Diluyente de Muestra
4. 1 x 14 mL Tampón Substrato
5. 1 x 14 mL Solución de Paro
6. 1 x 80 µL Conjugado Anti-IgG Humana
7. 4 x 50 mg Substrato PNPP (HAT13G) o
6 x 50 mg Substrato PNPP (HAT45G)
8. 1 x 100 µL Suero Control Positivo
9. 1 x 100 µL Suero Control Negativo
10. Láminas adhesivas de sellado

Material Necesario Adicionalmente:

1. Tubos para la muestra del paciente y para las diluciones de los controles y reactivos
2. Pipetas de transferencia
3. Micropipetas ajustables para dispensar 1 – 10 µL, 10 – 100 µL, y 100 – 1,000 µL 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 de papel absorbente
8. Lavador de microplacas o similar
9. Centrífuga capaz de separar suero de las muestras del paciente
10. Baño de agua de 37°C o incubador
11. Heparina, Porcino, USP 10,000 unidades/mL

Procedimiento del Test

1. Atemperar los reactivos a temperatura ambiente.
2. Preparar la Solución de Lavado diluyendo la Solución Concentrada de Lavado PF4. Añadir 1 volumen de la Solución Concentrada de Lavado PF4 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 consistente en dos (por duplicado) pocillos. Registrar la identidad de cada muestra en la Tabla de Resultados.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS Y CONTROLES

4. Diluir como se indica a continuación y mezclar bien:

	Volumen Diluyente de Muestra	Volumen Muestra
HPC	294 μ L	6 μ L
HNC	294 μ L	6 μ L
Muestra del Paciente	294 μ L	6 μ L

NOTA: Para obtener resultados exactos, es esencial la medición precisa de las muestras del paciente y de los controles.

- Sacar el marco de los micropocillos de la bolsa. Acto seguido, sacar los micropocillos y rápidamente separar las tiras no necesarias y volverlas a guardar en el interior de la bolsa protectora.

NOTA: Sólo se suministra un marco con el kit. No desecharlo hasta no 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.

- Añadir 300 μ L de la Solución de Lavado a todos los pocillos y dejar actuar a temperatura ambiente durante 5-10 minutos.

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

- Añadir 50 μ L del apropiado control diluido o muestra en los pocillos de la forma designada en la Tabla de Resultados.

NOTA: No añadir muestras ni reactivos a los pocillos del blanco.

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

- Sellar los micropocillos con una lámina adhesiva de sellado e incubar durante 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.

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

Tiras:	1 o 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

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

11. PASO DE LAVADO:

- Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- Añadir 300 μ L de Solución de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c hasta 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 tras el último lavado.

- Añadir 50 μ L de Conjugado diluido (preparado en un paso previo) a todos los pocillos EXCEPTO a los designados como BLANCOS.

- Sellar los micropocillos con una lámina adhesiva e incubar durante 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. Si se usa un incubador seco debe aumentarse 10 minutos el tiempo de incubación.

- Disolver el Substrato PNPP añadiendo 0.5 mL de agua desionizada o destilada al vial. Volver a tapar el vial y mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.

15. Diluir el PNPP 1 a 100 con el Tampón de Substrato.

Tiras:	1 o 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

Mezclar bien. Proteger de la luz hasta su uso.

16. PASO DE LAVADO:

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

Proceder rápidamente con los siguientes tres pasos.

17. Añadir 100 µL de la solución de PNPP diluida a todos los pocillos EXCEPTO a aquellos designados como BLANCOS.

18. Los micropocillos han de permanecer en oscuridad durante 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE (entre 22° y 25°C).

NOTA: Tras la adición del PNPP, el tiempo de incubación y la temperatura son críticos. NO VARIAR el tiempo de incubación o la temperatura establecidos. Para una mayor consistencia, empezar a medir el tiempo justo en el momento de la adición del reactivo al primer pocillo.

19. 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 del blanco.

20. 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.

21. 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.

22. Registrar los Resultados en la Tabla de Resultados.

CONTROL DE CALIDAD

El Control de calidad del PF4 IgGTM 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 de los reactivos.

Criterios para un test válido:

	Control Negativo	Control Positivo
Media DO	≤ 0.300	≥ 1.800

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

NOTA: Duplicados pobres pueden ser el resultado de omisiones de muestras o reactivos, adición irregular de reactivos, temperatura irregular durante las incubaciones, luz directa durante la incubación final o contaminación cruzada. Un fracaso del test en duplicado puede conducir a aceptar resultados erróneos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados con valores de DO iguales o mayores que 0.400 se consideran resultados positivos.

PROCEDIMIENTO PARA LA CONFIRMACIÓN DE ANTICUERPOS ASOCIADOS A HEPARINA

- 1) A 1 mL de Diluyente de Muestra añadir 10 µL de heparina (10,000 unidades/mL) para obtener una concentración final de 100 Unidades por mL.
- 2) Volver al paso nº4 descrito arriba. Diluir las muestras del paciente y el Control Positivo con Diluyente de Muestra conteniendo exceso de heparina. Diluir también la muestra del paciente y los Controles Positivo y Negativo con el Diluyente de Muestra incluido en el kit.
- 3) Rehidratar las tiras como antes. Añadir alícuotas de 50 µL de cada una de las diluciones del paciente y de los controles a pocillos por duplicado.
- 4) Proceder con el test según lo descrito en “Procedimiento del Test” empezando con el paso 9.

INTERPRETACIÓN DEL PROCEDIMIENTO CONFIRMATORIO

La inhibición de una reacción positiva en un 50% o más en presencia de exceso de heparina se considera confirmatoria para la presencia de anticuerpos específicos que reaccionan con PF4:heparina. Incluso el control positivo debería presentar también inhibición. La fórmula para determinar el % de inhibición es la siguiente:

$$\left[(1) - \left(\frac{\text{Muestra de paciente con Heparina} - \text{Control Negativo}}{\text{Muestra de paciente sin Heparina} - \text{Control Negativo}} \right) \right] \times 100 = \% \text{ de Inhibición}$$

Ejemplo: El suero del paciente da un valor de DO de 1.000 en la prueba estándar con un valor de control negativo de 0.200. Con exceso de heparina, el suero del paciente da un valor de DO de 0.400. El porcentaje de inhibición es:

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

La inhibición de una reacción positiva menor del 50% es un resultado equívoco. Este tipo de reacción viene dada por un pequeño porcentaje de anticuerpos en pacientes que son sospechosos de tener HIT Tipo II. No se ha establecido aún el significado de este tipo de reacción. No se ha determinado todavía si es seguro re-administrar heparina a pacientes cuyo suero da una reacción equívoca.¹²

LIMITACIONES

Pueden obtenerse resultados erróneos por contaminación bacteriana del material, períodos de incubación inadecuados, lavado o decantado inadecuado de los pocillos, exposición del substrato a la luz, omisión de reactivos, exposición a temperaturas superiores o inferiores a las requeridas, 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 dar lugar a falsos positivos en esta prueba.

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

Algunos anticuerpos con títulos bajos y baja avidéz pueden no ser detectados utilizando este ensayo.

Los complejos PF4:PVS usados en esta prueba pueden diferir ligeramente de los creados por PF4:heparina. Por tanto, es posible que algunos anticuerpos pudieran reaccionar con complejos PVS y no reaccionar con complejos heparina y viceversa.

Aunque una reacción positiva obtenida usando este método pueda indicar la presencia de un anticuerpo asociado a heparina, la detección de tales anticuerpos, sin embargo, NO CONFIRMA el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina (HIT).

Algunos pacientes pueden tener anticuerpos contra PF4 de forma natural.

En la evaluación de este producto no se han usado muestras de pacientes expuestos a heparina pero no en terapia por heparina. Por tanto, otras muestras de pacientes distintas de las obtenidas en la terapia con heparina no deberían ser analizadas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICO

Precisión

El intraensayo, interensayo y la imprecisión total del ensayo PF4 IgGTM han sido determinados. Tres muestras de distintas concentraciones de anticuerpo fueron preparadas diluyendo una muestra de suero que contenía un alto nivel de anticuerpos anti-PF4 :PVS en un pool de suero humano sin anticuerpos anti-PF4 :PVS. Las tres muestras positivas y una muestra negativa fueron analizadas con el PF4 IgGTM test en duplicado y en 10 pruebas separadas. Para obtener la imprecisión de los valores de DO, los datos

fueron analizados por ANOVA de acuerdo con el CLSI Document EP-5^a2. Los cálculos se muestran en la tabla incluida a continuación. Los resultados demostraron un CV $\leq 10\%$ para los valores de DO de todas las muestras. Por añadidura, los resultados registrados fueron analizados de acuerdo al CLSI Document EP12-A. Había un 100% de concordancia entre los resultados registrados intraensayo e interensayo para cada una de las muestras testadas.

Muestra	Media Valores de D.O.	SD Intraensayo	%cv Intraensayo	SD Interensayo	%cv Interensayo	SD Total	%cv Total
Negativa	0.090	0.005	5.6%	0.008	8.9%	0.009	10.0%
Positiva Baja	0.562	0.023	4.1%	0.056	10.0%	0.058	10.3%
Positiva Media	1.613	0.035	2.2%	0.075	4.7%	0.079	4.9%
Positiva Alta	2.701	0.069	2.6%	0.092	3.4%	0.092	3.8%

PF4 IgGTM Rango Normal

Ciento veinte muestras de suero fueron obtenidas de individuos normales sanos y fueron testadas (por duplicado) con el test PF4 IgGTM. Los resultados de D.O. no mostraron una distribución normal y, por tanto, un análisis no paramétrico fue usado para determinar la distribución normal de los valores de D.O. (intervalo de referencia del 95% con un intervalo de confianza del 90%). El extremo superior del rango normal fue calculado para ser de 0.352 unidades de D.O.

Método de Comparación: Comparación de PF4 IgGTM con PF4 ENHANCED[®] y el Test de Liberación de Serotonina (SRA)

Se dirigieron dos estudios independientes en los cuales el test de PF4 IgGTM fue comparado tanto con el test de PF4 ENHANCED[®] como con el Test de Liberación de Serotonina (SRA). El test PF4 ENHANCED[®] es un ELISA cualitativo para la detección de anticuerpos IgG, IgA e IgM asociados a heparina. Un total de 400 muestras de suero fueron testadas (Situación 1; n = 229 muestras, Situación 2; n = 171 muestras). Las siguientes tablas muestran el análisis de los resultados combinados de los dos estudios a partir de las comparaciones de los métodos.

PF4 ENHANCED[®]

		Positivo	Negativo	Total
PF4 IgG TM	Positivo	77	0	77
	Negativo	52	271	323
Total		129	271	400

Concordancia: 87%
 Co-positividad: 60% (95% Intervalo de Confianza = 51.1 – 67.8%)
 Co-negatividad: 100% (95% Intervalo de Confianza = 98.6 – 100.0%)

Ensayo de Liberación de Serotonina

		Positivo	Negativo	Total
PF4 IgG TM	Positivo	41	36	77
	Negativo	4	319	323
Total		45	355	400

Concordancia: 90%
 Co-positividad: 91% (95% Intervalo de Confianza = 79.3 – 96.5%)
 Co-negatividad: 90% (95% Intervalo de Confianza = 86.3 – 92.6%)

De las 4 muestras que fueron negativas en el test de PF4 IgGTM y positivas en el SRA, se encontraron con que tres de ellas contenían anticuerpos IgM o IgM e IgA reactivos contra el complejo PF4:PVS. La muestra restante fue también negativa en el test de SRA cuando fue testada por otro laboratorio.

Sustancias que pueden interferir

Las siguientes sustancias endógenas fueron testadas en el test PF4 IgGTM a la concentración indicada. El testaje fue llevado a cabo de acuerdo con CLSI EP7: Testaje de Interferencia en Química Clínica: Líneas Directivas Aprobadas. Cada sustancia fue añadida a muestras que contenían diversas respuestas frente a anticuerpos PF4:heparina (negativa, baja-, media-, y alta- positiva). Las muestras fueron después testadas en el test de PF4 IgGTM. Los resultados fueron comparados con aquellos obtenidos en el control en donde no fueron añadidas sustancias interferentes. Para todas las muestras testadas, las sustancias no tuvieron ningún efecto significativo (<10% de diferencia en los valores de D.O. entre la muestra y el control) en los resultados obtenidos en el test PF4 IgGTM.

Hemoglobina	500 mg/dL
Triglicéridos	500 mg/dL
Bilirrubina	20 mg/dL

Substancias Cross-Reactivas

Para poder determinar las posibles reactividades cruzadas entre el antígeno objetivo y otros anticuerpos distintos de los asociados a heparina, se testaron en este ensayo 68 muestras conteniendo una variedad de anticuerpos que incluían anticuerpos conocidos dirigidos contra aloantígenos plaquetarios, autoanticuerpos plaquetarios, anticuerpos anti HLA de clase I y factor anti-reumatoide y ninguno se encontró que tuviera reacciones cruzadas con el antígeno objetivo inmovilizado en los micropocillos.

REFERENCIAS

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 O 1-800-233-1843

REF

HAT13G o HAT45G

Rev. 2007-12-26 (S)



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



PF4 IgGTM

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