

PF4 ENHANCED®

USO

PF4 ENHANCED® é un test (ELISA) in fase solida preparato per determinare anticorpi reattivi con l'antigene piastrinico PF4 quando complessato a un componente polianionico come il Polivinil Sulfonato (PVS). Questi anticorpi sono riscontrati in pazienti in terapia con eparina.

Per uso diagnostico in vitro.

RIASSUNTO E SPIEGAZIONE

Un paziente che riceve il trattamento con eparina almeno una volta alla settimana sviluppa spesso trombocitopenia.^{1,2,3} In alcuni casi il livello delle piastrine si riduce solo leggermente e ritorna a livelli normali anche se si continua il trattamento. Questo tipo di trombocitopenia é chiamata trombocitopenia indotta da eparina di "Tipo I" (HIT) e non é anticorpo mediata.²

In altri pazienti la trombocitopenia é in genere severa ed é anticorpo mediata. Questa condizione é definita di "tipo II" HIT. L'HIT di Tipo I é generalmente considerata una condizione benigna, mentre i pazienti con HIT di Tipo II sono a rischio di sviluppare una trombocitopenia severa, così come trombosi arteriosa o venosa se si continua la terapia. Gli anticorpi associati a HIT di Tipo II possono essere determinati in modi diversi. Le tecniche più comunemente usate sono il test di aggregazione,⁴ il test di rilascio della Serotonina,⁵ e l'ELISA per il PF4.^{6,7,8}

E' noto che anticorpi associati al Tipo II riconoscono il sito antigenico piastrinico denominato PF4 e sono prodotti quando il PF4 é complessato a eparina o altro componente polianionico come il polivinil sulfonato (PVS).^{9,10,11}

Il kit PF4 ENHANCED® in ELISA fase solida fornisce microstrip rivestite del complesso PF4:PVS come target per la determinazione degli anticorpi associati alla HIT di Tipo II.

PRINCIPIO

Il siero paziente è aggiunto a microstrip rivestite con fattore 4 (PF4) ricombinante complessato a polivinil sulfonato (PVS). Se è presente un anticorpo che riconosce il sito PF4:PVS vi si legherà. Anticorpi non legati vengono lavati. Si dispensa l'antiglobulina umana coniugata con fosfatasi alcalina (Anti-IgG/A/M) ad ogni pozzetto e si incuba. Il coniugato Anti-IgG/A/M non legato viene lavato, si dispensa, infine, il substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato) dopo una incubazione di 30 minuti, si stoppa la reazione con la soluzione NaOH. La densità ottica della colorazione sviluppata è misurata fotometricamente.

REAGENTI

Numero massimo di test per kit: 13 (X-HAT13) o 45 (X-HAT45)

Tutti i reagenti devono essere conservati come indicato sull'etichetta.

- | | |
|-------------|--|
| MS | 1. Microstrip: microstrip a fondo piatto strip a cui è stato immobilizzato fattore 4 piastrinico purificato (PF4) complessato a polivinil sulfonato (PVS). I microstrip sono chiusi in busta risigillabile. Pronti all'uso. |
| HTCW | 2. PF4 Soluzione di Lavaggio Concentrata (10x): Tampone Tris (hydroxymethyl) aminomethane contenente sodio cloride e Tween 20. 1% sodio azide. Diluire con acqua deionizzata o distillat prima dell'uso. Conservare la soluzione di lavaggio a temperature ambiente fino a 48 ore o fino a 7 giorni a 2-8°C. |
| HSD | 3. Diluente Campione: Soluzione tampone fosfato. 0.05% sodio azide. Pronto all'uso. |
| SB | 4. Tampone Substrato: questa soluzione contiene dietanolamina e magnesio cloride. 0.02% sodio azide. Pronto all'uso. Proteggere dalla luce. |
| SS | 5. Soluzione Stoppante: 3 M NaOH. Pronto all'uso. Usare con cautela. |
| HAH | 6. Coniugato: anti globulina umana di capra coniugata con Fosfatasi alcalina (IgG/A/M). Contiene 0.1% sodio azide. Diluire con diluente campione prima dell'uso. |

- | | |
|------------|---|
| PN | 7. Substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato): in polvere. Sciogliere con acqua deionizzata o distillata e diluire nel tampone enzimatico prima dell'uso. Proteggere dalla luce. |
| HPC | 8. Siero Controllo Positivo: siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente Campione prima dell'uso. |
| HNC | 9. Siero Controllo Negativo: siero umano contiene 0.1% sodio azide. Diluire in Diluente Campione prima dell'uso. |
| PS | 10. Copripietra. |

AVVERTENZE

- Non usare i reagenti torbidi o contaminati.
- Usare con cautela per evitare la contaminazione del Diluente campione e del Coniugato. L'eventuale contaminazione di questi reagenti con siero umano neutralizza il Coniugato e porta al fallimento del test.
- Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.
- Strip e reagenti contenuti nel kit non devono essere usati in unione con altri kit.
- La sostituzione dei componenti del kit con altri può portare a risultati del test sbagliati.
- Gettare porzioni non utilizzate del coniugato dei controlli diluiti, e di PNPP sciolto o diluito alla fine di ogni test.
- Per preparare le diluizioni, seguire le istruzioni del produttore per la scelta delle pipette appropriate.
- L'incubazione finale con il substrato enzimatico é sensibile alla temperatura, dovrebbe essere eseguita in un area a 22 – 25°C.
- A causa delle variazioni nella strumentazione o nella temperatura ambientale, può essere necessario per il laboratorio stabilire un tempo di incubazione più lungo o più breve in modo da ottenere risultati corretti. L'incubazione finale può avere effetti sui valori dei controlli, é quindi importante monitorare periodicamente il valore della temperatura ambientale.

PRECAUZIONI

- Il siero umano usato per i controlli Positivo e Negativo è stato testato e riscontrato negativo per anticorpi anti HIV, HCV e HBsAg con metodi FDA approvati. Nessun metodo può, comunque, offrire una assoluta sicurezza dell'assenza di virus HIV, epatite C e epatite B o altri agenti infettivi. Quindi, tali materiali dovrebbero essere maneggiati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni dei reagenti forniti con i kit contengono sodio azide come conservante.
ATTENZIONE: Sodio azide reagisce con piombo e rame formando metalli di azidi esplosivi. Quando gettato nel lavandino sciacquare con molta acqua. Sodio azide é velenoso e tossico se ingerito.
- La Soluzione Stoppante (NaOH) é corrosiva. Evitare il contatto con pelle ed occhi. Gli schizzi devono essere puliti immediatamente.
- Quando i componenti del kit sono finiti gettarli seguendo le regole locali.

RACCOLTA CAMPIONI

Il sangue dovrebbe essere raccolto senza anticoagulante usando una tecnica asettica e dovrebbe essere testato fresco per minimizzare il rischio di ottenere reazioni falsamente positive o negative a causa della conservazione errata o della contaminazione dei campioni. I campioni che non possono essere immediatamente testati possono essere conservati a 2 – 8°C per 48 ore o congelati. Campioni congelati a –20°C o oltre rimangono in buone condizioni per anni (2-3 anni). Comunque per evitare gli effetti del deterioramento per effetto di congelamenti e scongelamenti ripetuti, si raccomanda di aliquotare i campioni e poi congelarli.

Il siero deve essere separato dalle cellule quando conservato o trasportato.

La presenza nel campione di particelle o aggregati può causare risultati falso positivi o scarsamente ripetibili. Centrifugare i campioni contenenti particelle prima del test.

Per questo test usare solo siero umano intero. La diluizione dei campioni con diluenti diversi da quello fornito può inficiare i risultati.

Campioni battericamente contaminati, emolizzati, lipemici, itterici, o inattivati al calore possono portare a risultati errati.

ATTENZIONE: Campioni prelevati con eparina come anticoagulante non devono essere testati con questo kit.

PROCEDURA

Materiali Forniti:

I flaconi possono contenere più reagente di quanto descritto sull'etichetta. Misurare i reagenti con pipette appropriate quando si preparano le diluizioni.

1. 4 – strip 1 x 8 con supporto (X-HAT13) o
12 – strip 1 x 8 con supporto (X-HAT45)
2. 1 x 50 mL PF4 Soluzione Concentrata
3. 1 x 30 mL Diluente Campioni
4. 1 x 14 mL Tampone Substrato
5. 1 x 14 mL Soluzione Stoppante
6. 1 x 80 µL Coniugato Umano Anti-IgG/A/M
7. 4 x 50 mg Substrato PNPP (X-HAT13) o
6 x 50 mg Substrato PNPP (X-HAT45)
8. 1 x 100 µL Siero Controllo Positivo
9. 1 x 100 µL Siero Controllo Negativo
10. Copri Piastre

Ulteriori Materiali Richiesti:

1. Provette per campioni, controlli e diluizioni
2. Pipette
3. Micropipette graduate per dispensare 1 – 10 µl, 10 – 100 µL, e 100 – 1,000 µL e pipette
4. Timer
5. Lettore per micropiastre per la lettura delle DO a 405 o 410 e 490 nm
6. Acqua deionizzata o distillata
7. Carta assorbente
8. Lavatore per micropiastre
9. Centrifuga per la separazione del siero o plasma pazienti
10. Bagno-maria o incubatore a 37°C
11. Eparina, Porcino, USP 10.000 unità/mL

Metodica

1. Portare i reagenti a temperatura ambiente.
2. Preparare la soluzione di lavaggio. Diluire 1 volume di PF4 soluzione concentrata in 9 volumi di acqua deionizzata o distillata. Miscelare bene.
3. Calcolare il numero dei campioni da testare. Assegnare la posizione dei campione usando il foglio di lavoro, due pozzetti (in doppio). Registrare l'identificativo di ogni campione sul foglio di lavoro.

PREPARARE CAMPIONI E CONTROLLI

4. Diluire come segue e miscelare bene:

	Volume Diluente Campione	Volume Campione
HPC	294 µL	6 µL
HNC	294 µL	6 µL
Campione Paziente	294 µL	6 µL

NOTA: Per l'accuratezza dei risultati è essenziale la misurazione precisa dei campioni e dei controlli.

5. Rimuovere gli strip necessari dalla busta. Rimuovere velocemente e risigillare nella busta gli strip inutilizzati.

NOTA: Con ogni kit viene fornito un solo supporto. Non gettarlo fino alla fine dell'utilizzo degli strip.

NOTA: Orientare il supporto in modo tale che il pozzetto A1 sia posizionato in alto in corrispondenza dell'angolo sinistro. Assicurarsi che tutti gli strip siano correttamente inseriti nel supporto. Etichettare o numerare ogni strip per evitare errori.

Mantenere il supporto nello stesso orientamento durante l'esecuzione del test.

6. Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio ai pozzetti e lasciare a temperatura ambiente per 5-10 minuti.
7. Aspirare o decantare e asciugare bene gli strip invertendo su carta assorbente.
8. Dispensare 50 µL dei controlli o dei campioni nei pozzetti corrispondenti.

NOTA: Non dispensare controllo o campioni nei pozzetti del bianco.

NOTA: Se si testano più campioni in una sola seduta preparare un solo set di controlli. IDENTIFICARE GLI STRIP PER EVITARE ERRORI.

9. Coprire la piastra ed incubare per 30-35 minuti a 37°C a bagno-maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.
10. Diluire il Coniugato 1 a 100 con il diluente campioni. Usare un contenitore di polipropilene.

Strip:	1 o 2 – 1 x 8	4 – 1 x 8	12 – 1 x 8
HAH	10 µL	20 µL	60 µL
HSD	1.0 mL	2.0 mL	6.0 mL

NOTA: Il coniugato é viscoso. Aspirare 2-3 volte con la pipetta prima di dispensare e sciacquare bene il puntale nel diluente. Miscelare bene.

11. LAVAGGIO:

- a) Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- b) Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio.
- c) Aspirare o decantare.
- d) Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- e) Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

NOTA: É importante rimuovere ogni residuo di soluzione dopo il lavaggio finale.

11. Dispensare 50 µL di coniugato diluito (come preparato al punto 10) in tutti i pozzetti tranne quelli destinati al BIANCO.
13. Coprire gli strip ed incubare per 30-35 minuti a 37°C in bagno maria. Se si usa un incubatore a secco aumentare l'incubazione di 10 minuti.
14. Sciogliere il PNPP in polvere aggiungendo nel flacone 0.5 mL di acqua deionizzata o distillata. Chiudere e miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.
15. Diluire il PNPP sciolto 1 a 100 in tampone Substrato.

Strip:	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

Miscelare bene. Proteggere dalla luce fino all'uso.

16. LAVAGGIO:

- a) Aspirare o decantare il contenuto di ogni pozzetto e asciugare bene su carta assorbente.
- b) Aggiungere 300 µL di soluzione di lavaggio.
- c) Aspirare o decantare.
- d) Ripetere i punti b + c per un totale di 3 o 4 lavaggi.
- e) Decantare energicamente per rimuovere ogni residuo di soluzione di lavaggio. Invertire su carta assorbente ed asciugare bene.

Passare velocemente agli step successivi.

17. Dispensare 100 µL PNPP diluito a tutti i pozzetti ad eccezione dei pozzetti destinati al BIANCO.

18. Incubare gli strip per 30 minuti a TEMPERATURA AMBIENTE (22 – 25°C) al buio.

NOTA: Tempi e temperatura di questa incubazione sono critici. NON variare i tempi e le temperature stabilite. Fare partire il tempo di incubazione al momento della dispensazione del PNPP al primo pozzetto.

19. Stappare la reazione dispensando 100 µL di soluzione stoppante ad ogni pozzetto nella stessa sequenza in cui si è aggiunto il substrato. Dispensare 200 µL di soluzione stoppante ai pozzetti del bianco.

20. Leggere le assorbanze (DO) di ogni pozzetto a 405 o 410 nm usando un filtro di riferimento a 490 nm. Se i risultati non possono essere letti immediatamente, riportare gli strip al buio per 30 minuti al massimo.

21. Sottrarre i valori del bianco ad ogni valore dei campioni e dei controlli. Molti lettori ELISA sono programmati per sottrarli automaticamente.

22. Registrare i risultati sul foglio di lavoro.

CONTROLLO DI QUALITA'

Il controllo di qualità PF4 ENHANCED® è incluso in ogni kit grazie alla presenza dei sieri di controllo negativo e positivo. Questi controlli dovrebbero essere inclusi in ogni esecuzione del test per aiutare a determinare la presenza di errori tecnici o non reattività dei reagenti.

Criteri di validazione dei test:

	Controllo Negativo	Controllo Positivo
Media DO	≤ 0.300	≥ 1.800

I valori di DO ottenuti in campioni in doppio possono variare del 20% massimo della media dei due valori. Campioni al di fuori di questi limiti dovrebbero essere ritestati.

NOTA: La non riproducibilità può essere causata da omissione dei reagenti o dei campioni, aggiunta inadeguata dei reagenti, temperatura di incubazione inadeguata, esposizione alla luce durante l'incubazione finale o cross contaminazione dei pozzetti. La non riproducibilità influenza l'accettazione dei risultati.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Risultati con valori di DO uguali o superiori a 0,400 DO sono considerati positivi.

METODICA DI CONFERMA DEGLI ANTICORPI EPARINO-DIPENDENTI

- 1) Aggiungere 10 µL di eparina ad 1 mL di diluente campione (10,000 unità/mL) concentrazione finale 100 Unità per mL.
- 2) Ritornare al punto 4. Diluire il siero paziente ed i controlli positivi con il diluente campione contenente l'eccesso di eparina. Diluire pazienti e controlli anche nel diluente campioni senza eparina.
- 3) Reidratare strip. Dispensare 50 µL di ogni paziente e controlli diluiti come al punto 2 nei pozzetti in doppio.
- 4) Eseguire il test come descritto in metodica iniziando dal punto.

INTERPRETAZIONE DEL TEST DI CONFERMA

L'inibizione della reazione positiva del 50% o più in presenza di eccesso di eparina conferma la presenza di anticorpi eparino-dipendenti caratteristici della HIT di Tipo II. Anche il controllo positivo deve mostrare inibizione. La formula che determina la % di inibizione è la seguente:

$$\left[(I) - \left(\frac{\text{Campione paziente con eparina} - \text{ControlloNegativo}}{\text{Campione paziente senza eparina} - \text{ControlloNegativo}} \right) \right] \times 100 = \% \text{ di Inibizione}$$

Esempio: Il siero paziente da un valore di DO 1.000 nel test standard con valore di controllo negativo 0.200. Con eccesso di eparina, il paziente da valore di DO 0.400. La percentuale di inibizione è:

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

L'inibizione di una reazione positiva inferiore al 50% é un risultato equivoco. Questo tipo di reazione é data da una piccola percentuale di anticorpi in pazienti con sospetta HIT di Tipo II. Il significato di questa reazione non é stato ancora stabilito. Non é ancora stato determinato fino a che punto sia consigliabile somministrare ancora eparina in pazienti con reazione equivoca al test.¹²

LIMITAZIONI

Risultati errati possono avvenire per contaminazione batterica dei componenti del kit, incubazione inadeguata, lavaggi inadeguati, esposizione alla luce del substrato, omissione dei reagenti, esposizione a temperature più elevate o inferiori a quelle indicate, o omissione di step di lavoro.

La presenza di immunocomplessi o aggregati immunoglobulinici nel paziente può causare un aumento di legami non specifici e produrre risultati falsamente positivi.

I risultati di questo test non dovrebbero essere usati come unica base per una decisione clinica.

Alcuni anticorpi a basso titolo o bassa avidità potrebbero non essere determinati da questo test.

Il complesso PF4:PVS usato in questo test può differire leggermente dal complesso creato da PF4:eparina. E', quindi, possibile che alcuni anticorpi reagiscano con il PVS a non con l'eparina e vice versa.

Anche se una reazione positiva può indicare la presenza di anticorpi eparino-dipendenti, la determinazione di questi anticorpi NON CONFERMA la diagnosi di trombocitopenia indotta da eparina (HIT).

Alcuni pazienti possono avere anticorpi anti-PF4 naturali.

Campioni di pazienti esposti ad eparina ma non in terapia non sono stati usati per la valutazione di questo prodotto. Quindi pazienti diversi da quelli in trattamento con eparina non dovrebbero essere testati con questo kit.

CARATTERISTICHE SPECIFICHE DEL TEST

Quando correttamente conservato ed usato in accordo alla procedura descritta, questo prodotto può determinare anticorpi diretti verso il complesso PF4:PVS.

Per garantire reattività e specificità ogni lotto di PF4 ENHANCED[®] é testato con campioni notoriamente reattivi con il complesso PF4:PVS così come con campioni privi di anticorpi.

Valutazione del Test

		Metodo di Confronto		Totale
		Positivo	Negativo	
PF4 ENHANCED [®]	Positivo	144	51*	195
	Negativo	2	452	454
	Totale	146	503	649

Concordanza: 91.8%

Co-positività: 98.6% Co-negatività: 89.9%

Metodo di Confronto: SRA = Test di Rilascio della Serotonina

* Dati aggiuntivi ottenuti da 9 di questi pazienti indicano che 6 su 9 aveva in corso la HIT. Il decorso clinico degli altri 3 ha reso incerta la diagnosi di HIT.¹⁰

Per determinare possibili cross-reazioni tra antigeni e anticorpi diversi da quelli eparino-dipendenti, sono stati testati con questo kit 63 campioni contenenti vari anticorpi inclusi anticorpi piastrino-specifici, anticorpi anti-HLA di classe I, e anti fattore reumatoide, nessuno di essi ha cross-reagito con gli antigeni immobilizzati ai pozzetti.

REFERENZE

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.™

PF4 ENHANCED®

- PER USO DIAGNOSTICO IN VITRO
- CONSERVARE A 2 – 8°C

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



REF

X-HAT13 o X-HAT45

Rev. 2007-06-28 (I)



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

www.gtidiagnostics.com