

PF4 ENHANCED®

UTILIZAÇÃO

O ensaio PF4 ENHANCED® é um imunoenensaio enzimático de fase sólida (ELISA) qualitativo concebido para detectar anticorpos reactivos com o factor plaquetário 4 (PF4) quando está complexado com compostos polianiónicos como o Sulfonato de Polivinil (PVS). Estes anticorpos encontram-se nalguns doentes submetidos a terapêutica com heparina.

Para Diagnostico *In Vitro*.

SUMÁRIO E EXPLICAÇÃO

Os doentes que recebem tratamento com heparina durante pelo menos uma semana desenvolvem frequentemente trombocitopenia.^{1,2,3} Nalguns casos os níveis de plaquetas apenas se reduzem ligeiramente e retomam o nível normal mesmo quando o tratamento com heparina continua. Este tipo de trombocitopenia é chamado Trombocitopenia Induzida por Heparina (HIT) do “Tipo I” e não é mediada por anticorpos.²

Noutros doentes a trombocitopenia é geralmente mais grave e é mediada por anticorpos. Esta situação é designada HIT “Tipo II”. A HIT Tipo I é geralmente considerada uma situação benigna, enquanto os doentes com HIT do Tipo II correm o risco de desenvolver uma trombocitopenia mais grave bem como trombose arterial ou venosa se a terapêutica com heparina continuar. Os anticorpos associados com a HIT do Tipo II podem ser detectados de várias formas. As técnicas mais vulgarmente utilizadas são o teste de agregação plaquetária,⁴ o teste de libertação de serotonina,⁵ e o ELISA factor 4 plaquetário.^{6,7,8}

É sabido que os anticorpos associados com a HIT do Tipo II reconhecem locais numa proteína plaquetária chamada “factor 4 plaquetário” (PF4) que se formam quando o PF4 é complexado com heparina ou outro composto polianiónico linear como o PVS.^{9,10,11}

No kit PF4 ENHANCED® os micropoços do ELISA de fase sólida contêm complexos PF4:PVS imobilizados que servem de alvo para a detecção de anticorpos associados com a HIT do Tipo II.

PRINCÍPIO

O soro do paciente é adicionado aos micropoços revestidos com factor 4 plaquetário (PF4) complexado ao sulfonato de polivinil (PVS). Se estiver presente um anticorpo que reconheça um local no PF4:PVS vai ocorrer ligação permitindo que os anticorpos, se presentes, se liguem. Os anticorpos não ligados são então lavados. Adiciona-se uma globulina anti-humana marcada com fosfatase alcalina (Anti-IgG/A/M) aos poços e incuba-se. A anti-IgG/A/M não ligada é removida por lavagem e adiciona-se o substrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Após um período de incubação de 30 minutos, a reacção é parada com uma solução de hidróxido de sódio. A densidade óptica da cor que se desenvolve é medida num espectofotómetro.

REAGENTES

Número máximo de testes por kit: 13 (X-HAT13) ou 45 (X-HAT45)

Todos os reagentes devem ser armazenados como indicado nos respectivos rótulos.

- | | |
|-------------|---|
| MS | 1. Micropoços: Micropoços de base achatada nos quais foi imobilizado factor plaquetário 4 (PF4) purificado por afinidade complexado com sulfonato de polivinil (PVS). As tiras de micropoços encontram-se em sacos de alumínio resseláveis. Prontos a usar. |
| HTCW | 2. Solução de Lavagem PF4 Concentrada (10x): Solução Tris (hidroximetil aminometano) tamponada com cloreto de sódio e Tween 20. Azida sódica 1%. Diluir com água desionizada ou destilada antes de usar. Armazenar a Solução de Lavagem de trabalho até 48 horas à temperatura ambiente ou até sete dias a 2 – 8°C. |
| HSD | 3. Diluente de Amostras: Solução Fosfato Salino tamponada. Azida sódica 0.05%. Pronto a usar. |
| SB | 4. Tampão Substrato: Esta solução contém dietanolamina e cloreto de magnésio. Azida sódica 0.02%. Pronto a usar. Proteger da luz. |
| SS | 5. Solução de Paragem: Hidróxido de sódio 3 M. Pronta a usar. Utilizar com cuidado. |

- | | |
|------------|---|
| HAH | 6. Conjugado: Anticorpo de cabra purificado por afinidade conjugado a fosfatase alcalina para imunoglobulina humana (IgG/A/M). Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostras antes de usar. |
| PN | 7. Substrato PNPP (p-nitrophenil fosfato): Pó cristalino. Reconstituir com água desionizada ou destilada e diluir em Tampão Substrato antes de usar. Proteger da luz. |
| HPC | 8. Soro Controlo Positivo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostras antes de usar. |
| HNC | 9. Soro Controlo Negativo: Soro Humano. Azida sódica 0.1%. Diluir em Diluente de Amostras antes de usar. |
| PS | 10. Seladores de placas. |

PRECAUCÕES

- Não usar reagentes turvos ou contaminados.
- Tem de se ter cuidado para evitar a contaminação do Diluente de Amostra e Conjugado. A contaminação inadvertida destes reagentes com soro humano resulta na neutralização do Conjugado e subsequentemente na ausência de resultados válidos.
- Não utilizar os reagentes para além da sua data de validade.
- Os micropoços e reagentes contidos no kit não devem ser usados em qualquer outro tipo de teste.
- A substituição dos componentes por outros que não sejam fornecidos no kit pode conduzir a resultados inconsistentes ou errados.
- Após cada ensaio, deitar fora quaisquer porções não usadas de Conjugado, Controlos Positivo e Negativo diluídos e PNPP reconstituído e diluído.
- Ao fazer as diluições, seguir as instruções do produtor das pipetas para uma técnica de dispensação e de lavagem apropriadas.
- A reacção do substrato enzimático que ocorre na incubação final é sensível à temperatura e deve ser efectuada numa área controlada a 22 – 25°C.
- Devido às variações nos instrumentos ou na temperaturas ambiente pode ser necessário ao laboratório estabelecer um tempo de incubação ligeiramente superior ou inferior para atingir resultados controlo válidos e consistentes. Como a temperatura da incubação final pode afectar os valores controlo, é importante monitorizar periodicamente a incubação à temperatura ambiente.

ATENÇÃO

- Todo o soro humano utilizado nos Controlos Positivo e Negativo foi testado e considerado negativo para anticorpos para VIH, VHC e HbsAg por métodos aprovados pela FDA. Contudo, nenhum método pode oferecer garantia completa da ausência de VIH, vírus da Hepatite C, vírus da Hepatite B ou outros agentes infecciosos. Assim, estes materiais devem ser manuseados como potencialmente infecciosos.
- Alguns dos reagentes fornecidos com este kit contêm azida sódica como conservante.
AVISO: A azida sódica reage com o chumbo e cobre das canalizações, formando azidas de metal altamente explosivas. Ao eliminar deve fazê-lo com água abundante para evitar a produção de explosões. A azida sódica é venenosa e é tóxica se ingerida.
- A Solução de Paragem (NaOH) é corrosiva. Evitar o contacto com os olhos e pele. Quaisquer derrames devem ser imediatamente limpos.
- Deitar fora todos os componentes, depois de usados, de acordo com as normas locais.

COLHEITA DA AMOSTRA

O sangue deve ser colhido sem anticoagulante usando técnicas assépticas e deve ser testado enquanto fresco para minimizar a probabilidade de obter reacções falso-positivas ou falso-negativas devido a armazenamento inadequado ou contaminação das amostras. As amostras que não possam ser testadas imediatamente devem ser armazenadas a 2 – 8°C por um máximo de 48 horas ou congeladas. As amostras congeladas a –20°C ou abaixo desse valor mantêm-se em boas condições durante vários anos (2-3 anos). Contudo, para evitar qualquer deterioração ou ciclos repetidos de congelamento/descongelamento recomenda-se que as amostras sejam aliquoteadas em pequenos volumes e então congeladas.

O soro deve ser separado dos eritrócitos ao ser armazenado ou transportado.

Partículas ou agregados na amostra podem causar resultados falso-positivos ou fracos valores duplicados. As amostras com este tipo de material devem ser centrifugadas antes de serem testadas.

Para este teste apenas é adequado soro de sangue total. A diluição prévia das amostras em algo que não soro total ELISA negativo pode afectar os resultados.

Amostras contaminadas, hemolizadas, lipémicas, ictericas ou inactivadas por calor podem dar resultados inconsistentes e devem ser evitadas.

AVISO: As amostras tratadas com heparina não devem ser utilizadas neste teste.

PROCEDIMENTO

Material Fornecido:

Os frascos podem conter mais reagente do que o descrito nos rótulos. Assegure-se da correcta medição dos reagentes através da utilização de um dispositivo apropriado, quando fizer as diluições.

1. 4 – 1 x 8 Tiras de micropoços com suporte (X-HAT13) ou
12 – 1 x 8 Tiras de micropoços com suporte (X-HAT45)
2. 1 x 50 mL Solução de Lavagem PF4 Concentrada
3. 1 x 30 mL Diluente de Amostra
4. 1 x 14 mL Tampão Substrato
5. 1 x 14 mL Solução de Paragem
6. 1 x 80 µL Conjugado IgG/A/M anti-Humano
7. 4 x 50 mg Substrato PNPP (X-HAT13) ou
6 x 50 mg Substrato PNPP (X-HAT45)
8. 1 x 100 µL Soro Controlo Positivo
9. 1 x 100 µL Soro Controlo Negativo
10. Seladores de Placa

Material Adicional Necessário:

1. Tubos teste para as diluições das amostras, controlos e reagentes.
2. Pipetas para transferência
3. Micropipetas ajustáveis a volumes 1 – 10 µL, 10 – 100 µL, e 100 – 1.000 µL e pontas descartáveis
4. Relógio
5. Leitor de microplaca com capacidade de leitura de DO na gama dos 405 ou 410 e 490 nm
6. Água desionizada ou destilada
7. Papel absorvente
8. Lavador ou dispositivo de lavagem de microplacas
9. Centrífuga com capacidade de separar soro ou plasma de amostras de pacientes
10. Incubadora ou banho a 37°C
11. Heparina, Porcino, USP 10.000 unidades/mL

Procedimento do teste

1. Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente
2. Preparar a Solução de Lavagem de trabalho diluindo a Solução de Lavagem PF4 Concentrada. Adicionar 1 volume de Solução de Lavagem PF4 Concentrada a 9 volumes de água desionizada ou destilada. Misturar bem.
3. Determinar o número de amostras a serem testadas. Com a Folha de Registo identificar cada amostra em dois poços (duplicado). Registrar a identificação de cada amostra na Folha de Registo.

PREPARAÇÃO DOS CONTROLOS E AMOSTRAS

4. Diluir da seguinte forma e misturar bem:

	Volume de Diluente de Amostra	Volume de Amostra
HPC	294 µL	6 µL
HNC	294 µL	6 µL
Amostra	294 µL	6 µL

NOTA: A medição precisa das amostras do doente e controlos é essencial para obter resultados rigorosos.

5. Remover os suporte de micropoços do saco. Reselar as tiras que não forem necessárias no saco de protecção.

NOTA: O kit apenas fornece um suporte. Não o deitar fora até todas as tiras terem sido utilizadas.

NOTA: Oriente o suporte com o A1 no canto superior esquerdo. Assegure-se que todas as tiras estão correctamente encaixadas no seu suporte. Marque ou numere cada tira para evitar erros.

6. Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho a todos os poços e deixar 5-10 minutos à temperatura ambiente.

7. Aspirar ou decantar vigorosamente e inverter em papel absorvente para evitar a secagem.

8. Adicionar 50 µL do controlo ou amostra aos poços apropriados como estabelecido na Folha de Registo.

NOTA: Não adicionar amostras ou reagentes aos poços do branco.

NOTA: Se forem testadas múltiplas amostras em simultâneo (é apenas necessário um conjunto de controlos) IDENTIFICAR CADA TIRA PARA EVITAR ERROS.

9. Selar os micropoços com o selador de placa e incubar 30-35 minutos num banho a 37°C. Se for utilizada uma câmara incubadora aumentar o tempo em 10 minutos

10. Diluir o Conjugado 1:100 em Diluente de Amostra. Utilizar um recipiente de polipropileno.

Tiras:	1 or 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: O conjugado é viscoso. Colocar a ponta 2-3 vezes no Conjugado antes de dispensar e enxaguar após a adição ao Diluente de Amostra. Misturar bem.

11. LAVAGEM:

- Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e bater invertido em papel absorvente.
- Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
- Aspirar or decantar.
- Repetir os passos b + c para um total de 3 ou 4 lavagens.
- Decantar ou remover vigorosamente qualquer resto de Solução de Lavagem residual. Inverter em papel absorvente para evitar a secagem.

NOTA: É importante remover completamente toda a Solução de Lavagem após a última lavagem.

12. Adicionar 50 µL de Conjugado diluído (feito num passo anterior) a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.

13. Selar os micropoços com o selador de placa e incubar 30-35 minutos num banho a 37°C. Se for utilizada uma câmara incubadora aumentar o tempo em 10 minutos.

14. Reconstituir o Substrato PNPP adicionando, 0.5 mL de água desionizada ou destilada, ao frasco. Fechar o frasco e misturar bem. Proteger da luz até ser utilizado.

15. Diluir o PNPP 1:100 em Tampão Substrato.

Tiras:	1 or 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

Misturar bem. Proteger da luz até ser utilizado.

16. LAVAGEM:

- Aspirar ou decantar o conteúdo de cada poço e bater invertido sobre papel absorvente.
- Adicionar 300 µL de Solução de Lavagem de trabalho.
- Aspirar or decantar.

- d) Repetir os passos b + c para um total de 3 ou 4 lavagens.
- e) Decantar vigorosamente para remover qualquer Solução de Lavagem residual Bater invertido em papel absorvente para evitar a secagem.

Prosseguir rapidamente com os próximos três passos.

17. Adicionar 100 µL da solução PNPP diluída a todos os poços EXCEPTO aos designados como BRANCO.

18. Manter os micropoços no escuro durante 30 minutos à TEMPERATURA AMBIENTE (22 – 25°C).

NOTA: O tempo de incubação e a temperatura após a adição do PNPP são críticos. NÃO alterar o tempo ou a temperatura de incubação estabelecidos. Para a consistência dos resultados, começar a contar o tempo logo após a adição do reagente ao primeiro poço.

19. Parara a reacção adicionando 100 µL de Solução de Paragem a cada poço na mesma sequência que foi adicionado o substrato. Adicionar 200 µL de Solução de Paragem aos poços branco.

20. Ler a absorvância (DO) de cada poço a 405 ou a 410 nm usando um filtro de referência de 490 nm. Se os resultados não puderem ser lidos imediatamente, colocar os poços no escuro até 30 minutos.

21. Subtrair os valores obtidos nos poços branco a todos os outros poços, amostras e controlos. Muitos leitores ELISA estão programados para efectuar este passo automaticamente.

22. Registrar os resultados na Folha de Registo.

CONTROLO DE QUALIDADE

O controlo de qualidade PF4 ENHANCED® é efectuado no sistema pela inclusão dos Controlos Positivo e Negativo. Estes controlos devem ser incluídos em cada teste ensaio para ajudar a determinar se ocorreram erros técnicos ou falha de reagentes.

Critérios para um teste válido:

	Controlo Negativo	Controlo Positivo
DO média	≤ 0.300	≥ 1.800

As DO obtidas nos testes em duplicado devem cair em 20% da média dos dois valores. As amostras cujos resultados não estejam neste limite devem ser testadas novamente.

NOTA: Duplicados fracos podem resultar de falta de reagente ou amostra, adição irregular de reagentes, temperaturas de incubação irregulares, exposição à luz na incubação final ou contaminação entre poços. Não testar em duplicado pode conduzir à obtenção de resultados errados.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Resultados com valores de DO iguais ou maiores que 0,400 DO são considerados como resultados positivos.

PROCEDIMENTO PARA CONFIRMAÇÃO DOS ANTICORPOS ASSOCIADOS A HEPARINA

- 1) Adicionar 10 µL de heparina (10.000 unids/mL) a 1 mL de Diluente de Amostra para uma concentração final de 100 Unidades por mL.
- 2) Volte ao passo 4 acima descrito. Diluir as amostras e o controlo positivo no Diluente de Amostra com excesso de heparina. Diluir também a amostra e os controlos positivo e negativo no Diluente de Amostra incluído no kit.
- 3) Rehidratar tiras antes de usar. Adicionar 50 µL de cada amostra e controlo em duplicado.
- 4) Prosseguir o teste como descrito no “Procedimento de Teste” começando com o passo 9.

INTERPRETAÇÃO DO PROCEDIMENTO CONFIRMATÓRIO

A inibição de uma reacção positiva, em 50% ou mais, na presença de heparina em excesso, é considerada confirmatória para anticorpos dependentes de heparina característicos da HIT do Tipo II. O controlo positivo deve também mostrar inibição. A fórmula para determinar a % de inibição é a seguinte:

$$\left[(1) - \left(\frac{\text{Amostra do doente com Heparina} - \text{Controlo Negativo}}{\text{Amostra do doente sem Heparina} - \text{Controlo Negativo}} \right) \right] \times 100 = \% \text{ inibição}$$

Exemplo: O soro do doente apresenta um valor de DO de 1,000 no ensaio standard com um valor do controlo negativo de 0,200. Com heparina em excesso, o soro do doente apresenta um valor de DO de 0,400. A percentagem de inibição é:

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

A inibição de uma reacção positiva em menos de 50% é um resultado equívoco. Este tipo de reacção acontece devido a uma pequena percentagem de anticorpos em doentes com suspeita de terem HIT Tipo II. O significado deste tipo de reacção ainda não está estabelecido. Ainda não foi determinado se é seguro readministrar heparina a doentes cujo soro dá uma reacção equívoca.¹²

LIMITAÇÕES

Resultados errados podem ser consequência de contaminação bacteriana dos materiais de teste, períodos de incubação não adequados, decantação ou lavagem dos poços inadequadas, exposição do substrato à luz, omissão de reagentes, exposição a temperaturas superiores ou inferiores às requeridas, ou omissão de passos.

A presença de imunocomplexos ou outros agregados de imunoglobulinas na amostra pode causar uma ligação não-específica aumentada e produzir resultados falso-positivos.

Os resultados deste ensaio não devem ser utilizados como a única base para uma decisão clínica.

Alguns anticorpos de baixo título e de baixa avidéz podem não ser detectados com este ensaio.

Os complexos PF4:PVS usados neste ensaio podem diferir ligeiramente dos criados por PF4:heparina. Assim, é possível que alguns anticorpos possam reagir com complexos PVS e não com complexos de heparina e vice versa.

Apesar de uma reacção positiva com este ensaio poder indicar a presença de anticorpos associados à heparina, a detecção destes anticorpos NÃO CONFIRMA o diagnóstico de trombocitopenia induzida por heparina (HIT).

Alguns doentes possuem anticorpos para PF4 que aparecem naturalmente.

Na avaliação deste produto não foram utilizadas amostras de doentes expostos a heparina mas não sujeitos a terapêutica com heparina. Assim, não devem ser testadas amostras que não sejam de doentes sujeitos a terapêutica com heparina.

CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE PERFORMANCE

Quando armazenado adequadamente e utilizado de acordo com os procedimentos acima descritos, este produto pode detectar anticorpos dirigidos contra complexos PF4:PVS.

De forma a assegurar uma reactividade e especificidade adequadas, cada lote de PF4 ENHANCED[®] é testado com amostras que se sabe possuírem anticorpos reactivos com complexos PF4:PVS bem como amostras que não tenham tais anticorpos.

Avaliação de Performance

		Método Comparativo		Total
		Positivo	Negativo	
PF4 ENHANCED [®]	Positivo	144	51*	195
	Negativo	2	452	454
	Total	146	503	649

Concordância: 91.8%

Co-positividade: 98.6% Co-negatividade: 89.9%

Método Comparativo: Ensaio de Libertação de Serotonina

* Informação adicional obtida de 9 destes doentes indicou que 6 deles tinham uma evolução clínica consistente com HIT. A evolução clínica dos restantes 3 deixou incerto o diagnóstico de HIT.¹⁰

De forma a determinar uma possível reactividade cruzada entre o antígeno alvo e anticorpos que não os associados à heparina, foram testadas 63 amostras com uma variedade de anticorpos que incluíram anticorpos conhecidos para aloantígenos plaquetários, anticorpos para HLA classe I, e factores reumatóides e nenhum apresentou reactividade cruzada com o antígeno alvo imobilizado nos micropoços.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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®

- PARA DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- ARMAZENAR A 2 – 8°C

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



REF

X-HAT13 ou X-HAT45

Rev. 2007-06-28 (P)



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

www.gtidiagnostics.com