

PF4 ENHANCED®

PROPÓSITO DE EMPLEO

PF4 ENHANCED® es un ensayo cualitativo en fase sólida inmuno-enzimático (ELISA) para detectar anticuerpos reactivos con factor 4 plaquetario (PF4) cuando forma complejos con compuestos polianiónicos tales como Polivinilsulfonato (PVS). Estos anticuerpos se encuentran en algunos pacientes en tratamiento con heparina.

Para Uso en Diagnóstico *In Vitro*.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

Los pacientes que reciben tratamiento por heparina por al menos una semana a menudo desarrollan trombocitopenia.^{1,2,3} En algunos casos los niveles de plaquetas se reducen solo ligeramente y regresan 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 es mediada por anticuerpos.²

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

Es conocido que los anticuerpos asociados con el HIT Tipo II reconocen sitios en las proteínas de las plaquetas designados como “factor 4 plaquetario” (PF4) que se crean cuando el PF4 forma un complejo con heparina u otro compuesto polianiónico lineal tal como Polivinilsulfonato (PVS).^{9,10,11}

El PF4 ENHANCED® ELISA fase sólida contiene microcubetas con complejos PF4:PVS inmovilizados como objetivos para la detección de anticuerpos asociados con el HIT Tipo II.

PRINCIPIO

Se añade suero o plasma de paciente a microcubetas tapizadas con complejo factor 4 plaquetario (PF4) con Polivinilsulfonato (PVS). Si un anticuerpo reconoce el lugar donde se encuentra se producirá el enlace permitiendo, si estuviera presente, que el anticuerpo se enlace. Los anticuerpos no ligados se eliminan por lavado. Se añade a los pocillos un reactivo anti-inmunoglobulina humana marcado con fosfatasa alcalina (Anti-IgG/A/M) y se incuba. La Anti-IgG/A/M no ligada se elimina por lavado y se añade el sustrato PNPP (p-nitrofenil fosfato). Tras un período de incubación de 30 minutos, se para la reacción añadiendo la solución de paro. Con un espectrofotómetro se mide la densidad óptica del color desarrollado.

REACTIVOS

Número máximo de pruebas por kit: 13 (X-HAT13) o 45 (X-HAT45)

Los reactivos deben conservarse según las instrucciones de la etiqueta.

- | | |
|-------------|---|
| MS | 1. Microcubetas: tiras de microcubetas de fondo plano a las cuales se han inmovilizado complejo Factor 4 Plaquetario PF4 con polivinilsulfonato (PVS) purificado por afinidad. Las tiras de las microcubetas están dentro de la bolsa embalaje. Listo para el uso. |
| HTCW | 2. PF4 Concentrado de Lavado (10X): Solución tamponada de fosfato conteniendo cloruro sódico y Tween. 1% azida sódica. Diluir con agua desionizada o destilada antes del uso. Almacenar la solución de trabajo de Lavado hasta 48 horas a temperatura ambiente o hasta siete días de 2 a 8°C. |
| HSD | 3. Diluyente de Muestra: Solución salina tamponada de Fosfato. 0.05% azida sódica. Lista para el uso. |
| SB | 4. Tampón Substrato: Esta solución contiene dietanolamina y cloruro magnésico. 0.02% azida sódica. Listo para el uso. Proteger de la luz. |
| ESS | 5. Solución de Paro: Listo par el uso. |

HAH	6. Conjugado: Anticuerpo de cabra a Inmunoglobulina Humana purificado por afinidad conjugado con Fosfatasa Alcalina (IgG/A/M). 0.1% azida sódica. Diluir con Diluyente de Muestra antes del uso.
PN	7. PNPP (p-nitrofenil fosfato) Substrato: Polvo Cristalino. Reconstituir con agua desionizada o destilada y diluir en tampón de Substrato antes del uso. Proteger de la luz.
HPC	8. Suero Control Positivo: Suero Humano. 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. Tapas para placas.

PRECAUCIONES

- No utilizar reactivos turbios o contaminados.
- **SE DEBE** tener cuidado de evitar la contaminación del Diluyente de Muestra y del Conjugado. La contaminación inadvertida de estos reactivos con suero humano provocaría la neutralización del Conjugado y el fallo de la prueba.
- No usar reactivos después de su fecha de caducidad.
- Las microcubetas 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.
- Seguir las instrucciones del fabricante de las pipetas en cuanto a aspiración y dispensación para la preparación correcta de las diluciones.
- La reacción Enzima substrato de la última incubación es sensible a la temperatura y debería realizarse 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 resultados de controles consistentemente válidos. Debido a que la temperatura de la incubación final puede afectar a los valores de los controles, es importante monitorizar periódicamente la temperatura de la habitación.

ADVERTENCIA

- Todos los sueros humanos utilizados en los Controles Positivo y Negativo para este producto han sido probados y encontrados negativos para los anticuerpos a HIV, HCV y HBsAg mediante métodos aprobados por la FDA. De todas formas ninguna prueba puede ofrecer completa seguridad de ausencia de virus de 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 latamente explosivas. Cuando se deseche en el fregadero deberá enjuagarse con gran cantidad de agua para prevenir el crecimiento de azidas. La azida sódica es un veneno y es tóxica si se ingiere.
- Al terminar desechar todos los componentes siguiendo el reglamento local.

TOMA DE MUESTRA

La sangre se debe recolectar en ACD o citrato sodico (plasma) o sin anticoagulante utilizando (suero) utilizando la técnica aséptica y debería analizarse fresca lo antes posible para minimizar la posibilidad de obtener reacciones falsos positivos o falsos negativos debido al deficiente almacenaje o contaminación de la muestra. Las muestras que no puedan analizarse de forma inmediata deberían almacenarse a 2 y 8°C por no más de 48 horas o congelarlas. Las muestras congeladas a -20°C o inferior, permanecen en buenas condiciones por varios años (2-3 años). Sin embargo, para evitar el efecto nocivo de repetidos ciclos descongelación/congelación, se recomienda alicuotar las muestras en pequeños volúmenes y conservarlas congeladas. Evitar los congeladores antiestancia.

Para almacenamiento o transporte, el suero o plasma debe ser separado de las células rojas.

Las partículas o agregados en la muestra pueden provocar falsos positivos o poca repetibilidad. Las muestras conteniendo partículas deberán aclararse por centrifugación antes de analizarlas.

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

Las muestras contaminadas por microorganismos, hemolizadas, lipémicas, ictéricas o inactivadas por calor pueden dar resultados inconsistentes y deberían evitarse.

ATENCIÓN: No deben emplearse en esta prueba 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 microcubetas con soporte (X-HAT13) o
12 - 1 x 8 Tiras de microcubetas con soporte (X-HAT45)
2. 1 x 50 mL PF4 Soluc Conc. Lavado
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/A/M Humana
7. 4 x 50 mg PNPP Substrato (X-HAT13) o
6 x 50 mg PNPP Substrato (X-HAT45)
8. 1 x 100 µL Suero Control Positivo
9. 1 x 100 µL Suero Control Negativo
10. Tapas para Placas

Material Necesario Adicionalmente:

1. Tubos para la muestra del paciente y diluciones de 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 papel absorbente
8. Lavador de microplacas o similar
9. Centrífuga capaz de separar suero o plasma de las muestras de paciente
10. Baño de agua de 37°C o incubador
11. Heparina, Porcino, USP 10,000 unidades/mL

Procedimiento de la prueba

1. Aclimatar los reactivos a temperatura ambiente.
2. Prepara la Solución de Lavado diluyendo el concentrado de lavado. Añadir 1 volumen de PF4 Concentrado de Lavado a 9 volúmenes de agua desionizada o destilada. Mezclar bien.
3. Determinar el número de muestras a probar. Utilizando la Hoja de registro, asignar a cada muestra una localización consistiendo de dos (duplicar) cubetas. Registrar la identidad de cada muestra en la Hoja de registro.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y CONTROLES

4. Diluir como sigue y mezclar bien:

	Volumen Diluyente de Muestra	Volumen Muestra
HPC	294 µL	6 µL
HNC	294 µL	6 µL
Muestra Paciente	294 µL	6 µL

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

- Sacar las microcubetas del marco de microcubetas de la bolsa. Sacar las microcubetas de la bolsa y rápidamente separar las tiras no necesarias y colocarlas en la bolsa protectora.

NOTA: Solo se suministra el marco con el kit. No desechar hasta haber utilizado todas las tiras.

NOTA: Orientar el marco con el pocillo A1 en la esquina superior izquierda. Asegurarse que todas las tiras estén correctamente situadas y encajadas en el marco. Etiquetar o enumerar cada tira para evitar errores. Mantener la misma orientación de la placa durante toda la prueba.

- Añadir 300 µL de Solución de Lavado de trabajo a todos los pocillos y dejar que alcance la temperatura ambiente en 5-10 minutos.

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

- Añadir 50 µL del control apropiado o muestra en las cubetas, tal como designe en la Hoja de registro.

NOTA: No añadir ni muestras ni reactivos a las cubetas de blanco.

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

- Sellar las microcubetas con una tapa para placas e incubar por 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
HAH	10 µL	20 µL	60 µL
HSD	1.0 mL	2.0 mL	6.0 mL

NOTA: El conjugado es viscoso. Mojar la punta de pipeta 2-3 veces en el Conjugado antes de dispensar y enjuagar 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 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- Aspirar o decantar.
- Repetir los pasos b + c para 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 después del último lavado.

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

- Sellar las microcubetas con una Tapa para placas e incubar 30-35 minutos en un baño de agua a 37°C. Si se usa un incubador seco debe aumentarse en 10 minutos el tiempo de incubación.

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

- Diluir el PNPP 1 a 100 en 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:

- a) Aspirar o decantar el contenido de cada pocillo y sacudir sobre papel absorbente.
- b) Añadir 300 µL de Solución de trabajo de Lavado.
- c) Aspirar o decantar.
- d) Repetir los pasos b + c para un total de 3 o 4 lavados.
- e) 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 aquellos designados como BLANCOS.

18. Dejar atemperar las microcubetas en oscuridad por 30 minutos a TEMPERATURA AMBIENTE (22 y 25°C).

NOTA: Después de la adición de PNPP el tiempo de incubación y la temperatura son críticos. NO VARIAR el tiempo de incubación establecido o la temperatura. Para mayor consistencia empezar a medir el tiempo después de la adición del reactivo a la primera cubeta.

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 de 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 ENHANCED® 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 del reactivo.

Criterios para una prueba válida:

	Control Negativo	Control Positivo
Media DO	≤ 0.300	≥ 1.800

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

NOTA: La pobre repetitividad de resultados se puede deber a omisiones de muestra o reactivo, desigual adición de reactivos, temperatura desigual durante las incubaciones, luz durante la incubación final o contaminación cruzada. El fallo en el test en duplicado puede conducir a aceptar resultados erróneos.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

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

PROCEDIMIENTO PARA CONFIRMACIÓN DE ANTICUERPOS ASOCIADOS A HEPARINA

- 1) A 1 mL de Diluyente de Muestra añadir 10 µL de heparina (10,000 unidades/mL) a una concentración final de 100 Unidades por mL.
- 2) Volver al paso nº4. Diluir las muestras del paciente y Control Positivo en Diluyente de Muestra conteniendo exceso de heparina. Diluir también la muestra del paciente y controles positivo y negativo con el Diluyente de muestra incluido en el kit.
- 3) Rehidratar tiras como antes. Añadir alícuotas de 50 µL de cada uno de diluciones de paciente y control a pocillos por duplicado.
- 4) Proceder con el análisis descrito en "Procedimiento de la prueba" empezando en paso 9.

INTERPRETACIÓN DEL PROCEDIMIENTO CONFIRMATORIO

La inhibición de una reacción positiva en el 50% o más, en presencia de exceso de heparina se considera confirmatorio de anticuerpo característico heparino-dependiente del Tipo II HIT. Incluso el control positivo puede también presentar inhibición. La fórmula para determinar el % de inhibición es como sigue:

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

Ejemplo: El muestra del paciente da un valor DO de 1.00 en la prueba estándar con un valor de control negativo de 0.200. Con exceso de heparina, el muestra del paciente da un valor:

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

La inhibición de una reacción positiva menos del 50% es un resultado equívoco. Este tipo de reacción se da en un pequeño porcentaje de anticuerpos en pacientes que se sospecha tengan HIT Tipo II. No se ha establecido aún el significado de este tipo de reacción. No se ha determinado aún si es seguro re-administrar heparina a pacientes muestra 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 sustrato 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 producir falso-positivos en esta prueba.

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

Algunos anticuerpos de títulos bajos, baja avididad pueden no detectarse 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 que no reaccionan con complejos heparina y viceversa.

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

Algunos pacientes pueden tener anticuerpos a 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, no deberían analizarse otras muestras de pacientes que las de aquellos que están en terapia de heparina.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO ESPECÍFICO

Cuando se almacena adecuadamente y se utiliza de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, este producto puede anticuerpos dirigidos contra complejos PF4:PVS.

Para asegurar la adecuada reactividad y especificidad, cada lote de PF4 ENHANCED[®] es testado con muestras conocidas por contener anticuerpos reactivos con complejos PF4:PVS así como con muestras conocidas por estar libres de tales anticuerpos.

Evaluación de Rendimiento

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

Acuerdo: 91.8%
Co-positividad: 98.6% Co-negatividad: 89.9%
Método comparativo: SRA = Ensayo de liberación de Serotonina

* Datos adicionales de 9 de estos pacientes indicaron que 6 de 9 cursaban una clínica consistente con HIT. La clínica de los 3 restantes hizo el diagnóstico de HIT incierto.

Para determinar las posible reactividad cruzada entre el antígeno objetivo y otros anticuerpos distintos de los asociados a heparina, se probaron 63 muestras conteniendo una variedad de anticuerpos que incluían anticuerpos conocidos a aloantígenos plaquetarios, autoanticuerpos plaquetarios, anticuerpos a HLA clase I, y antifactor reumatoide, y ninguno se encontró que tuviera reacciones cruzadas con el antígeno objetivo inmovilizado en las microcubetas.

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®

PF4 ENHANCED®

- PARA USO EN DIAGNÓSTICO *IN VITRO*
- ALMACENAR A 2 y 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. 2010-03-29 (S)



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



www.gtidiagnostics.com