

**Aplicación**

Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> es un inmunoensayo automatizado en los sistemas de la familia ACL TOP para la detección semi-cuantitativa en plasma humano filtrado de los anticuerpos totales que reaccionan con el factor plaquetario 4 (PF4) cuando está acompañado con heparina. Los anticuerpos asociados a la heparina se encuentran habitualmente en pacientes con trombocitopenia inducida por heparina o trombositis (TTH).

**Sumario y principio**

La trombocitopenia inducida por heparina (TTH) es una enfermedad provocada por un inmunocomplejo, que puede causar elevada morbilidad y mortalidad en pacientes que reciben terapia con heparina.<sup>1</sup> La TTH es una enfermedad paradójica ya que la administración de un anticoagulante para la prevención de trombositis, puede provocar un riesgo muy elevado de complicaciones trombóticas venosas y arteriales.<sup>2</sup> Se sospecha la existencia de TTH, cuando los pacientes tratados con heparina no fluoroclorada (HNF) o con heparina de bajo peso molecular (HBPm) muestran un descenso del recuento de plaquetas superior al 50% del nivel basal, habitualmente entre el quinto y el décimo día del inicio del tratamiento.<sup>3</sup> También se han descrito casos con un inicio más temprano o más tardío.<sup>4</sup> El diagnóstico rápido es muy importante porque, de confirmarse un cuadro del TTH, el tratamiento con heparina debe suspenderse y usarse anticoagulantes alternativos.

La enfermedad de TTH de tipo II, el tipo inmunológico, está causada por la aparición de anticuerpos activadores de las plaquetas, dirigidos principalmente contra el factor plaquetario 4 (PF4), cuando se da en contacto formando un complejo con la heparina (PF4/H).<sup>4</sup> Estos anticuerpos son la causa primaria de la inducción de la trombosis venosa y arterial. La actual hipótesis de trabajo es que una exposición temprana del individuo a los complejos de PF4/H, quizás inducida por factores endógenos no relacionados con la heparina, causaría la agregación del PF4/H y la activación de las células B mediante las células T. En otra opción, más reciente, estas células B podrían activarse de nuevo, transfiriendo, en presencia de agregados de PF4/H inducidos por el tratamiento con heparina.<sup>2</sup> La evolución de la patología está principalmente asociada con los anticuerpos dependientes de heparina del tipo IgG.<sup>3</sup> Sin embargo la presencia de anticuerpos únicamente del tipo IgM y/o IgA se ha observado en algunos pacientes, incluyendo casos con complicaciones trombóticas.<sup>5</sup>

El análisis de anticuerpos anti-PF4/H combinado con una adecuada supervisión médica constituyen una gran ayuda en el manejo de los pacientes con sospecha de TTH. Particularmente, un resultado negativo de anticuerpos anti-PF4/H puede dar soporte a la decisión clínica de descartar la presencia de TTH y de continuar con el tratamiento de heparina.<sup>2</sup> Un resultado débilmente positivo de anticuerpos anti-PF4/H puede indicar que los anticuerpos no lograrán a activar a las plaquetas, mientras que una fuerte positividad puede indicar un alto riesgo de TTH. En ambos casos, se recomienda la confirmación con un test funcional. Antes de proceder con la confirmación o exclusión del diagnóstico de TTH debe realizarse una nueva supervisión clínica teniendo en cuenta el resultado de las pruebas de laboratorio.<sup>2</sup>

El kit Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> es un inmunoensayo turbidimétrico de partículas de látex para la detección de anticuerpos totales asociados a la heparina presentes en los enfermos de TTH. Las partículas de látex se sensibilizan con un anticuerpo monoclonal que se asemeja a los anticuerpos humanos de TTH.<sup>6</sup> Si se mezcla el reactivo látex con la muestra del paciente, en presencia de PF4 de plaquetas humanas previamente acompañadas con polivinil sulfonato (PVS), se produce una reacción de aglutinación competitiva, siendo el grado de aglutinación inversamente proporcional a la concentración de anticuerpos en la muestra, y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causado por los agregados.

**Composición**

El kit Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> contiene:

- [R]** **Reactivo látex** (Núm. Cat. 0020301210): 2 viales de 1,8 mL de una suspensión de partículas de látex de poliestirano sensibilizadas con anticuerpo monoclonal del ratón anti-PF4-heparina en tampón Tris, que contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservante.
- [E]** **Estabilizador** (Núm. Cat. 0020301220): 2 viales de 3,2 mL de un tampón isotónico que contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservante.
- [Com]** **Complejo** (Núm. Cat. 0020301230): 2 viales x 0,8 mL de una solución de un complejo PF4-PVS (PF4 de plaquetas humanas acompañadas con PVS), en tampón isotónico que contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservante. Contiene 0,02% de Bronidol<sup>TM</sup> como conservante.
- [C]** **Calibrador** (Núm. Cat. 0020301240): 2 viales de 1 mL de una solución de anticuerpo monoclonal anti-PF4-heparina en tampón isotónico que contiene albúmina de suero bovino, estabilizantes y conservante.

**Medidas de Precaución y Advertencias**

El material usado en este producto ha sido verificado por métodos aprobados por la FDA y ha resultado no reactivo al Antígeno de Superficie de la Hepatitis B (HBeAg), a los anticuerpos anti-HCV y anti-HIV 1/2. Manipular con precaución como si fuese potencialmente infeccioso.<sup>7</sup> Todos los reactivos excepto el Complejo contienen azida séptica, que puede reaccionar con las tuberías metálicas dando lugar a azidas altamente explosivas. Tomar las precauciones adecuadas para su desecho.

El Reactivo Látex, el Estabilizador, el Complejo y el Calibrador contienen material de origen bovino. Todos los animales donantes proceden de establecimientos libres de BSE. El ganado fue inspeccionado por un veterinario antes y después de su muerte, y aparentemente los animales estaban libres de material infeccioso o contagioso. Sin embargo, el material debe tratarse como potencialmente infeccioso.

El Reactivo Látex, el Complejo, el Estabilizador, y el Calibrador no se han clasificado como reactivos peligrosos.

- Clase de peligro: ninguna
- Indicações de peligro: ninguna
- Consejos de prudencia: ninguna

Este producto es para diagnóstico *in vitro*.

**Preparación**

**Reactivo Látex:** Mezclar suavemente el vial por inversión antes de usarlo. No agitar. Evitar la formación de espuma.

**Estabilizador:** Mezclar suavemente el vial antes de usarlo. No agitar. Evitar la formación de espuma.

**Complejo:** Mezclar suavemente el vial antes de usarlo. No agitar. Evitar la formación de espuma.

**Calibrador:** Mezclar suavemente el vial antes de usarlo. No agitar. Evitar la formación de espuma.

**Nota:** Las burbujas en la superficie de los líquidos pueden interferir con los sensores de nivel de líquido de los instrumentos.

**Conservación y estabilidad de los reactivos**

Los viales no abiertos y conservados a 2-8°C son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el etiquetado. No congelar los reactivos.

**Reactivos -** Los reactivos una vez abiertos son estables durante 2 meses a 2-8°C en el vial original o 36 horas cuando se colocan a 15°C en los sistemas de la familia ACL TOP de una forma continuada.

Cuando los reactivos se dejan en el instrumento en una sesión de 1 hora y los viales se conservan entre sesión y sesión bien tapados a 2-8°C, los reactivos son estables por un tiempo acumulado de hasta 16 horas. Este estudio de tiempo acumulado en el instrumento se distribuyó a lo largo de 15 días.

Cuando los reactivos se dejan en el instrumento en una sesión de 2 horas y los viales se conservan entre sesión y sesión bien tapados a 2-8°C, los reactivos son estables por un tiempo acumulado de hasta 16 horas. Este estudio de tiempo acumulado en el instrumento se distribuyó a lo largo de 9 días. No congelar los reactivos.

Cuando los reactivos se dejan en el instrumento en una sesión de 4 horas y los viales se conservan entre sesión y sesión bien tapados a 2-8°C, los reactivos son estables por un tiempo acumulado de hasta 20 horas. Este estudio de tiempo acumulado en el instrumento se distribuyó a lo largo de 9 días. No congelar los reactivos.

Horas/sesión	Sesiones	Duración del estudio (días)	Tiempo acumulado (horas)
1	4	120	4
2	8	15	16
4	5	9	20

Las comprobaciones se realizaron en las secuencias citadas intentando imitar distintos patrones de trabajo. El uso de los reactivos Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> en otras secuencias puede mostrar resultados distintos. Se recomienda realizar un programa de control de calidad.

**NOTA:** Todos los componentes del kit Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> Reactivo Látex, Estabilizador y Complejo tienen la misma estabilidad y deben usarse apareados en los Sistemas de Coagulación de L. Si se sustituye un vial de alguno de los reactivos, el resto de componentes debe ser también sustituido al mismo tiempo independientemente del contenido residual de los mismos.

**Calibrador -** Usar inmediatamente después de abierto. El calibrador una vez abierto es estable 3 horas cuando se coloca a 15-25°C en los sistemas de la familia ACL TOP.

**Método de ensayo**

Las instrucciones completas del ensayo se encuentran en el correspondiente Manual del Usuario del instrumento y/o en el Manual de Aplicaciones.

**Recolección y preparación de las muestras**

Recoger nuevas partes de sangre recién extraída por punción venosa sobre una parte de anticoagulante citrato trisódico. Para la recolección, manejo y conservación del plasma seguir las recomendaciones del Documento H21-AS del CLSI.<sup>8</sup>

Si se han congelado las muestras, descongelarlas rápidamente a 37°C y centrifugarlas antes de analizarlas. Se debe realizar el ensayo de las mismas antes de transcurrir 2 horas de su descongelación y centrifugación.

**Reactivos adicionales y plasmas de control**

Los siguientes reactivos y controles no se suministran con el kit y deberán pedirse por separado. Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> Controles Núm. Cat. 0020013200 Diluyente de factores Núm. Cat. 0000757600

**Control de Calidad**

Para realizar un programa completo de control de calidad, se recomienda el uso de dos niveles de control.<sup>9</sup> Los controles Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> Bajo y Alto se han diseñado a tal efecto. Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar, y debe realizar un programa de control de calidad para monitorizar sus resultados. Los controles deben ser analizados como mínimo una vez por cada turno de 8 horas, de acuerdo con la normativa de Buenas Prácticas del Laboratorio. El Manual del Usuario contiene información adicional. Consultar la publicación de Westgard *et al* para la identificación y resolución de situaciones anormales del control de calidad.<sup>10</sup>

**Trazabilidad de los calibradores y controles**

Los valores indicados fueron obtenidos a partir de múltiples determinaciones en los sistemas de la familia ACL TOP usando lotes específicos de reactivos y un Estándar Interno.

**Resultados**

Los resultados de HIT-Ab<sub>PF4</sub> se informan en U/mL (Unidades Arbitrarias de Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub>).

Rango del test: Sistema	Auto Run on	Auto Run off
Familia ACL TOP	0 - 5,7 U/mL	0 - 16 U/mL

Cuando el instrumento tiene activada la opción "run", el instrumento realiza una dilución automática y corrige el resultado final por el factor de dilución, expandiendo el rango del test a 16 U/mL. Si el resultado todavía es superior al rango válido expandido, se debe testear muestras que informen resultados por encima de 16 U/mL, deben diluirse manualmente 1:10 con el Diluyente de factores (50 µL de muestra + 450 µL de Diluyente de factores) y reanalizarse como una muestra normal. Los resultados deben entonces multiplicarse por 10.

Aunque un resultado positivo obtenido usando este ensayo puede indicar la presencia de anticuerpos asociados a la heparina, un resultado positivo **NO CONFIRMA** el diagnóstico de TTH. Algunos pacientes pueden tener anticuerpos naturales anti-PF4.

**Limitaciones/Interferencias**

Concentraciones de hemoglobina hasta 495 mg/dL, de bilirrubina hasta 18 mg/dL, de triglicéridos (Intralipid<sup>®</sup>) hasta 375 mg/dL, de factor reumatoide hasta 1000 U/mL, y de anticuerpos humanos anti-ratón (i-HAMA) hasta 1 µg/mL no afectan los resultados de HIT-Ab<sub>PF4</sub> en los sistemas de la familia ACL TOP.

Muestras de pacientes no sospechosos de TTH y de pacientes tratados con heparina (HNF o HBPm) fueron comprobadas con Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub>. Las 20 muestras de pacientes tratados con HBPm, con un rango de concentración de heparina de entre 0,25-1,08 U/mL, dieron por debajo del cut-off recomendado. De las 22 muestras de pacientes tratados con HNF, con un rango de concentración de heparina de entre 0,15-6,74 U/mL, solo 2 de ellas dieron ligeramente por encima del cut-off. Sin embargo, no hubo correlación entre los resultados de TTH y el nivel de concentración de heparina.

Se comprobaron 26 muestras de pacientes diagnosticados del síndrome de anticuerpos antilipídicos (SAPL) con Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub>. Todas las muestras dieron resultado negativo con Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> demostrando que dichos anticuerpos no interfieren en el ensayo.

**Valores esperados**

No se debe esperar la presencia de anticuerpos anti-PF4/H en la población normal. A continuación se describe una serie de estudios realizados en los sistemas de la familia ACL TOP para determinar el cut-off más óptimo del kit Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub>.

Se comprobaron 131 muestras de plasma de individuos aparentemente sanos (donantes de banco de sangre). El intervalo de referencia del 95%, fue de 0-0,6 U/mL. También se comprobaron 51 muestras de una población de pacientes expuestos a heparina (HNF y HBPm) sin sospecha alguna de TTH. El intervalo de referencia del 95% fue de 0-1,2 U/mL.

Finalmente, una comparación de métodos realizada con el ensayo de liberación de serotonina (SRA) utilizando 66 muestras de plasma de pacientes sospechosos de TTH (31 muestras SRA positivas y 35 SRA negativas) mostró que el cut-off óptimo determinado a través de los resultados del ensayo de SRA es de 1,0 U/mL (Coincidencia 92,4%, Ck = 83,2% - 97,5%).

En base a estos estudios se ha determinado que en muestras de pacientes tratados con heparina, los resultados de Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub> iguales o superiores a 1,0 U/mL pueden indicar la presencia de anticuerpos de TTH. Los resultados del ensayo deben usarse junto con el resto de información clínica, en la elaboración del diagnóstico.

**Características técnicas**

**Precisión:** El estudio de la precisión intraserial (reproducibilidad) y total (dentro del ensayo) fue realizado en diferentes series.

ACL TOP	Media (U/mL)	CV% (Intraserial)	CV% (Total)
Control bajo HIT-Ab <sub>PF4</sub>	0,7	0,00 (0%)	0,11 (0,5)
Control alto HIT-Ab <sub>PF4</sub>	3,5	4,9	6,1
Muestra débil HIT-Ab <sub>PF4</sub>	1,6	4,9	8,1
Muestra alta HIT-Ab <sub>PF4</sub>	5,2	2,8	3,5
Muestra muy alta HIT-Ab <sub>PF4</sub>	10,0	5,5	9,5

El control bajo comprobado en el estudio de precisión anterior siempre reportó resultados por debajo del cut-off.

**Comparación de métodos**

Se realizó internamente una comparación de métodos, con 257 muestras congeladas de pacientes sospechosos de TTH usando un kit de ELISA disponible comercialmente.

Los resultados resumidos a continuación se basan en un cut-off de 1,0 U/mL del kit Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub>.

N	% Co-Positividad (95% C.I.)	% Co-Negatividad (95% C.I.)	% Concordancia (95% C.I.)	Hemosil HIT-Ab <sub>PF4</sub> resultados	
				ELISA resultados	Hemosil HIT-Ab <sub>PF4</sub> resultados
257	85,0% (77,4% - 92,0%)	93,7% (88,7% - 96,9%)	90,7% (86,4% - 93,9%)	+	14
				-	148

**Evaluación clínica**

Se realizó un estudio multi-centrico en 3 hospitales, con 414 muestras comparando con un ensayo de ELISA disponible comercialmente.

Las muestras eran de pacientes expuestos a heparina que mostraban síntomas relacionados con TTH y que se sospechaba tenían TTH.

Los resultados resumidos a continuación se basan en un cut-off de 1,0 U/mL del kit Hemosil HIT-Ab<sub>PF4</sub>.

Ensayo comparativo	N	%Co-Positividad (95% C.I.)	%Co-Negatividad (95% C.I.)	% Concordancia (95% C.I.)	Hemosil HIT-Ab <sub>PF4</sub> resultados	
					ELISA resultados	Hemosil HIT-Ab <sub>PF4</sub> resultados
Test de ELISA	414	80,2% (74,9% - 80,8%)	94,6% (91,5% - 96,7%)	+	33	
				-	313	

La precisión y los datos de correlación se han obtenido usando lotes específicos de reactivos y de controles.