

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 434**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2017** **E 17184389 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020** **EP 3438667**

54 Título: **Prueba de unión para el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**07.10.2021**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE DIAGNOSTICS  
PRODUCTS GMBH (100.0%)  
Emil-von-Behring-Strasse 76  
35041 Marburg, DE**

72 Inventor/es:

**SCHWARZ, HERBERT;  
ALTHAUS, HARALD y  
ZANDER, NORBERT**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 862 434 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Prueba de unión para el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina

La presente invención se encuentra en el área del diagnóstico in vitro y hace referencia a una prueba de unión de automatización sencilla para la detección de trombocitopenia inducida por heparina, en la cual se utilizan partículas recubiertas con proteína FcγRIIIa.

La trombocitopenia inducida por heparina (TIH) es una enfermedad trombótica que puede surgir en el contexto de una terapia con heparina y puede causar complicaciones tromboembólicas potencialmente mortales. Los pacientes afectados por dicha enfermedad producen anticuerpos que se unen a un complejo de heparina y factor plaquetario 4 (PF4), los así denominados como anticuerpos complejo anti PF4-heparina. In vitro, el complejo PF4-heparina unido al anticuerpo se une a la superficie de los trombocitos y provoca la activación plaquetaria. Esto conduce a una disminución del recuento de plaquetas y a un mayor riesgo de tromboembolismo.

Para diagnosticar HIT se usan esencialmente dos principios de prueba. El primer principio de prueba se basa en la detección directa de anticuerpos anti complejo PF4-heparina en una muestra de fluido corporal de un paciente. Para ello, una muestra se pone en contacto con un complejo de PF4-heparina o con un complejo de PF4 y otro polianión adecuado (como sulfonato de polivinilo) y la unión de cualquier anticuerpo del complejo anti PF4-heparina presente en la muestra se detecta utilizando procedimientos de prueba inmunológicos convencionales (por ejemplo, ELISA). Bakchoul, T. et al. ("Perspectivas actuales sobre el diagnóstico de laboratorio de HIT", International Journal of Laboratory Hematology 2014, 36 (3): 296-305) describen un ensayo de aglutinación de látex competitivo en el cual la unión de un anticuerpo del anti complejo PF4-heparina añadido a partículas recubiertas con PF4/ sulfonato de polivinilo es inhibida por anticuerpos de la muestra. Sin embargo, resulta desventajoso que la detección de anticuerpos del anti complejo PF4-heparina si bien es sensible, no es suficientemente específica, es decir, la detección de los anticuerpos no es suficiente para un diagnóstico de HIT positivo, mientras que un resultado negativo excluye HIT con certeza. Por lo tanto, se recomienda la confirmación mediante una prueba funcional basada en un segundo principio de prueba.

El segundo principio de prueba funcional se basa en la detección del efecto activador de plaquetas de los anticuerpos del anti complejo PF4-heparina. Con este principio de prueba, los trombocitos lavados de uno o más donantes normales se mezclan con una muestra de plasma o suero de un paciente y con heparina, y la activación plaquetaria se mide usando marcadores de activación conocidos, tales como la cantidad de serotonina liberada (prueba de liberación de serotonina), o usando la reacción de agregación detectable visualmente de las plaquetas (prueba HIPA). Cuando la muestra de un paciente contiene anticuerpos del anti complejo PF4-heparina, se puede determinar el aumento de la activación plaquetaria en comparación con una muestra normal (sin tales anticuerpos). Cuker, A. et al. ("Nuevos ensayos de diagnóstico para la trombocitopenia inducida por heparina", Blood 2013, 121 (18): 3727-3732) describen la detección de anticuerpos del anti complejo PF4-heparina activadores de células, en donde los linfocitos B que se transfectan con un receptor FcγRIIIa acoplado al gen indicador de luciferasa se ponen en contacto con la muestra y se mide la actividad luciferasa en el lote de prueba.

Las pruebas funcionales basadas en trombocitos presentan la desventaja de que las plaquetas deben procesarse en procesos manuales complejos y, debido a su acotada vida útil, sólo se pueden utilizar frescas. Además, siempre se debe utilizar una mezcla de plaquetas de múltiples donantes para compensar las variaciones biológicas entre preparaciones de plaquetas individuales a fin de posibilitar un cierto grado de estandarización.

El objeto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para la detección de anticuerpos del anti complejo PF4-heparina en una muestra de fluido corporal en el cual se eviten las desventajas antes mencionadas, en particular, el uso de plaquetas.

Se ha descubierto que en una mezcla de reacción obtenida mediante la mezcla de una muestra con heparina o complejo PF4-heparina y con una fase sólida particulada no celular y la determinación de la aglutinación de la fase sólida particulada no celular, la presencia de anticuerpos anti complejo PF4-heparina se puede detectar en la muestra cuando la fase sólida particulada no celular está recubierta con proteína FcγRIIIa aislada.

El objeto de la presente invención consiste por lo tanto en un procedimiento para la detección de anticuerpos anti complejo PF4-heparina en una muestra de fluido corporal. El procedimiento comprende los siguientes pasos:

i. Provisión de una mezcla de reacción mezclando la muestra

- con heparina o un polisacárido no ramificado que se une a PF4 o un polianión que se une a PF4; o
- con el complejo PF4-heparina o con un complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o con un polianión; y

- con una fase sólida de partículas no celulares.

ii. Medición de la aglutinación de la fase sólida particulada no celular en la mezcla de reacción;

iii. Comparación de la aglutinación medida de este modo en la mezcla de reacción con un valor de referencia predeterminado para la aglutinación en mezclas de reacción que contienen muestras de fluidos corporales de donantes que se sabe que no contienen anticuerpos anti complejo PF4-heparina; y

iv. Determinación de la presencia de anticuerpos anti complejo PF4-heparina en la muestra cuando la aglutinación determinada en la mezcla de reacción supera el valor de referencia;

en donde la fase sólida particulada no celular está recubierta con proteína FcγRIIIa aislada.

La muestra de fluido corporal proviene preferentemente de un ser humano. De manera preferida se trata de una muestra de fluido corporal esencialmente libre de plaquetas, en particular, de plasma o suero.

La muestra de fluido corporal se puede mezclar con un polisacárido no ramificado que se une a PF4 o con un polianión que se une a PF4. Se conoce un gran número de sustancias que se unen a PF4 que conforman un complejo con PF4, que se une por los anticuerpos anti complejo PF4-heparina a detectar. Los polisacáridos no ramificados adecuados son, por ejemplo, heparina, heparina no fraccionada (UFH), heparina fraccionada (LMWH), sulfato de dextrano y fucoidan. Los polianiones adecuados son, por ejemplo, sulfato de polivinilo, sulfonato de polivinilo, fosfato de polivinilo, fosfonato de polivinilo, sulfato de poliestireno y sulfonato de poliestireno.

Alternativamente, la muestra de fluido corporal se puede mezclar con un complejo PF4-heparina o con un complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o con un polianión.

Además, la muestra se mezcla con una fase sólida particulada no celular que se recubre con proteína FcγRIIIa aislada.

En el contexto de la presente invención, por el término "fase sólida particulada" se debe entender partículas no celulares que presentan un diámetro aproximado de al menos 20 nm y no más de 20 μm, normalmente entre 200 nm y 350 nm, preferiblemente entre 250 y 320 nm, de manera especialmente preferida, entre 270 y 290 nm, muy especialmente preferente 280 nm. Las micropartículas pueden presentar una forma regular o irregular. Pueden representar esferas, esferoides, esferas con cavidades o poros más o menos grandes. Las micropartículas pueden consistir en material orgánico, inorgánico o en una mezcla o combinación de ambos. Las mismas pueden tratarse de un material poroso o no poroso, inflamable o no inflamable. En principio, las micropartículas pueden presentar cualquier densidad, pero se prefieren las partículas con una densidad cercana a la densidad del agua, tal como aproximadamente 0,7 hasta aproximadamente 1,5 g/ml. Las micropartículas preferidas se pueden suspender en soluciones acuosas y son estables en suspensión durante el mayor tiempo posible. Pueden ser transparentes, parcialmente transparentes u opacas. Las micropartículas pueden constar de múltiples capas, como las así denominadas como partículas de "núcleo y cubierta" con un núcleo y una o más capas envolventes. El término micropartículas incluye, por ejemplo, cristales de tinte, soles de metal, partículas de sílice, partículas de vidrio y partículas magnéticas. Las micropartículas preferidas son partículas que pueden suspenderse en soluciones acuosas y están compuestas de material polimérico insoluble en agua, en particular, compuestas por polietilenos sustituidos. Partículas de látex muy especialmente preferidas son, por ejemplo, poliestireno, polímeros de ácido acrílico, polímeros de ácido metacrílico, polímeros de acrilonitrilo, acrilonitrilo butadieno estireno, acetato de polivinilo acrilato, polivinilpiridina, cloruro de vinilo acrilato. Resultan de particular interés las partículas de látex con grupos reactivos en su superficie, tales como, por ejemplo, grupos carboxilo, amino o aldehído, que permiten la unión covalente de la proteína FcγRIIIa aislada a las partículas de látex. Para los propósitos de esta invención, las células o bacterias humanas, animales, vegetales o fúngicas no están incluidas explícitamente en el término "fase sólida particulada".

El término "proteína FcγRIIIa aislada" debe entenderse como una proteína FcγRIIIa producida de forma recombinante o sintética o como una proteína FcγRIIIa nativa, es decir de fuentes naturales, por ejemplo, de leucocitos humanos purificada. Los sistemas de expresión procariotas o eucariotas conocidos, como la expresión en bacterias (por ejemplo, E. coli), en levaduras (por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae, Pichia pastoris), en cultivos de células vegetales, animales o humanas, son adecuados para la producción de proteína FcγRIIIa recombinante. Para la producción de proteína FcγRIIIa sintética son adecuadas técnicas conocidas para la síntesis de proteínas in vitro, como, por ejemplo, la síntesis en fase sólida (por ejemplo, síntesis de péptidos de Merrifield). La proteína FcγRIIIa que se utiliza en el procedimiento conforme a la invención se trata preferentemente de una proteína FcγRIIIa producida de manera recombinante que se produjo en un cultivo de células humanas, preferentemente, en un cultivo de células embrionarias de riñón humano (células HEK).

La proteína FcγRIIIa (sinónimo: proteína CD32a) se trata preferentemente de proteína FcγRIIIa humana. El término "proteína FcγRIIIa" comprende no sólo la proteína FcγRIIIa completa sino también fragmentos de la proteína FcγRIIIa completa que son capaces de unirse a inmunocomplejos compuestos de complejo PF4-heparina y anticuerpos anti complejo PF4-heparina unidos al mismo. El término "proteína FcγRIIIa" también incluye no sólo la proteína FcγRIIIa de tipo salvaje o fragmentos de la misma, sino también proteínas FcγRIIIa con una o más sustituciones de aminoácidos que son capaces de unirse al complejo PF4-heparina, como, por ejemplo, una sustitución conocida en la posición 131 de la proteína FcγRIIIa humana. La proteína FcγRIIIa o un fragmento de proteína FcγRIIIa se puede fusionar en el término N con una secuencia de señal heteróloga, es decir, con un polipéptido que normalmente no está presente en la proteína FcγRIIIa humana, que, sin embargo, tiene una influencia positiva en la expresión y/o secreción de la proteína FcγRIIIa expresada de manera recombinante en el sistema de expresión seleccionado. Además, la proteína FcγRIIIa o un fragmento de proteína FcγRIIIa se puede fusionar en el terminal C con una o más etiquetas de afinidad que permiten la unión de, por ejemplo, la proteína expresada de forma recombinante a un portador de afinidad, lo que permite, por ejemplo, la purificación de la proteína FcγRIIIa expresada de forma recombinante. Se prefieren las etiquetas de afinidad pequeñas con una longitud de no más de 12 aminoácidos. Se prefieren particularmente las etiquetas de afinidad del grupo His-Tag, Flag-Tag, Arg-Tag, c-Myc-Tag y Strep-Tag. Los portadores de afinidad adecuados que se unen a una etiqueta de afinidad con alta afinidad consisten, por ejemplo, en anticuerpos específicos, cationes inmovilizados (por ejemplo, Ni<sup>2+</sup> con afinidad para las etiquetas His) u otros tipos de compañeros de unión (por ejemplo, estreptavidina con afinidad para etiquetas Strep).

Cuando la muestra de fluido corporal contiene anticuerpos del anti complejo PF4-heparina, los mismos se unen a los complejos PF4-heparina en la mezcla de reacción. Los inmunocomplejos formados se unen a la proteína FcγRIIIa y provocan la aglutinación de la fase sólida particulada en la mezcla de reacción.

La medición de la aglutinación de la fase sólida particulada en la mezcla de reacción se puede realizar fotométricamente, por ejemplo, de manera turbidimétrica o nefelométrica. Las pruebas de unión basadas en el principio de dispersión de luz reforzada por partículas se conocen aproximadamente desde 1920 (para una descripción general, consulte Newman, D.J. et al., Inmunoensayo de dispersión de luz mejorada por partículas. *Ann Clin Biochem* 1992; 29: 22-42) En este contexto, se utilizan preferentemente partículas de poliestireno con un diámetro de 0,1 a 0,5 µm, de manera particularmente preferida con un diámetro de 0,15 a 0,35 µm. Preferentemente se utilizan partículas de poliestireno con funciones amina, carboxilo o aldehído. También se utilizan de manera preferida partículas de corteza/ núcleo. La síntesis de las partículas y el acoplamiento covalente de ligandos se describe, por ejemplo, en Peula, J.M. et al., Acoplamiento covalente de anticuerpos a grupos aldehído en portadores de polímero. *Revista "Journal of Polymer Science": Materiales en Medicina* 1995; 6: 779-785.

Alternativamente, la medición de la aglutinación de la fase sólida particulada en la mezcla de reacción se puede realizar midiendo una señal que es generada por un sistema de generación de señales cuando un primer y un segundo componente del sistema de generación de señales se colocan espacialmente próximos entre sí. En este contexto, una primera fracción de la fase sólida particulada está asociada con un primer componente de un sistema generador de señales y una segunda fracción de la fase sólida particulada está asociada con un segundo componente del sistema generador de señales; en donde el primer y el segundo componente del sistema de generación de señales interactúan de tal manera que se crea una señal detectable cuando el primer y segundo componente del sistema de generación de señales se colocan en proximidad espacial entre sí y la aglutinación de la fase sólida particulada en la mezcla de reacción se mide en función de la señal creada.

En esta forma de ejecución del procedimiento conforme a la invención, el sistema generador de señales comprende al menos un primer y un segundo componente, que trabajan juntos de tal manera que se genera una señal detectable cuando se colocan en proximidad espacial entre sí y pudiendo así interactuar uno con otro. Una interacción entre los componentes debe entenderse en particular como una transferencia de energía, es decir, la transferencia directa de energía entre los componentes, por ejemplo, por radiación de luz o de electrones, así como a través de moléculas químicas reactivas como el oxígeno singlete de vida corta. La transferencia de energía puede tener lugar de un componente a otro, pero también es posible una cascada de diferentes sustancias a través de las cuales tiene lugar la transferencia de energía. Por ejemplo, los componentes pueden consistir en un par de un donante de energía y un receptor de energía, como, por ejemplo, un fotosensibilizador y un agente quimioluminiscente (EP-A2-0515194, tecnología LOCI®) o un fotosensibilizador y un fluoróforo (WO 95/06877) o yodo radiactivo 125 y fluoróforo (Udenfriend et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 8672-8676) o extintores de fluoróforos y fluorescencia (US 3,996,345). De manera particularmente preferida, el primer componente del sistema generador de señales consiste en un agente quimioluminiscente y el segundo componente del sistema generador de señales en un fotosensibilizador o viceversa y en la mezcla de reacción se mide la quimioluminiscencia.

Después de que se haya medido la aglutinación en la mezcla de reacción (por ejemplo, determinando el cambio máximo en la absorción de la mezcla de reacción), la aglutinación medida de ese modo se compara con un valor de referencia predeterminado. La aglutinación, que se mide utilizando el mismo procedimiento en mezclas de reacción (o que fue medida de antemano) que contienen muestras de fluidos corporales de donantes que se sabe que no contienen anticuerpos del anti complejo PF4-heparina, resulta adecuada como valor de referencia. Por lo general, para determinar un valor de referencia en una gran cantidad de muestras de donantes sanos que se sabe que no

5 tienen anticuerpos del anti complejo PF4-heparina, se mide la aglutinación y después se compara con la aglutinación de una gran cantidad de muestras de donantes que padecen HIT y presentan anticuerpos complejo anti PF4-heparina. Por lo tanto, un valor de referencia puede ser, por ejemplo, un valor límite que permite diferenciar muestras con y muestras sin anticuerpos complejo anti PF4-heparina. Cuando la aglutinación medida en una mezcla de reacción excede el valor de referencia, esto permite determinar la presencia de anticuerpos del anti complejo PF4-heparina en la muestra. Cuando, por el contrario, la aglutinación medida en la mezcla de reacción cae por debajo del valor de referencia, esto permite determinar la ausencia de anticuerpos del anti complejo PF4-heparina en la muestra.

10 Otro objeto de la presente invención consiste en un procedimiento para el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina; en donde con un procedimiento conforme a la invención se detecta la presencia de anticuerpos del anti complejo PF4-heparina en una muestra de fluido corporal de un paciente.

Otro objeto de la presente invención consiste en un test de prueba para la ejecución de un procedimiento conforme a la invención. El kit de prueba contiene al menos los siguientes componentes:

15 a. un primer reactivo que contiene heparina, un polisacárido no ramificado que se une a PF4 o un polianión que se une a PF4 o un complejo de PF4-heparina o un complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o con un polianión; y

b. un segundo reactivo que contiene una fase sólida particulada no celular que se recubre con proteína FcγRIIa aislada.

El primer reactivo puede contener:

20 • un polisacárido no ramificado que se une a PF4, preferentemente del grupo heparina, heparina no fraccionada, heparina fraccionada, sulfato de dextrano y fucoidan; o

• un polianión que se une a PF4, preferentemente, del grupo sulfato de polivinilo, sulfonato de polivinilo, fosfato de polivinilo, fosfonato de polivinilo, sulfato de poliestireno y sulfonato de poliestireno; o

• Complejo PF4-heparina; o

25 • un complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o un polianión.

El primer y el segundo reactivo están previstos para proporcionar la mezcla de reacción con la muestra de fluido corporal.

30 En un kit de prueba preferido, la fase sólida particulada no celular contenida en el segundo reactivo consiste en partículas de látex. Un kit de prueba de este tipo es adecuado para medir la aglutinación mediante métodos fotométricos.

35 Otra forma de ejecución del kit de prueba contiene, además del primer y del segundo reactivo, un tercer reactivo que también contiene una fase sólida particulada no celular que está recubierta con proteína FcγRIIa aislada. La fase sólida de partículas no celulares del segundo reactivo está asociada, en este contexto, con un primer componente de un sistema generador de señales y la fase sólida de partículas no celulares del tercer reactivo está asociada con un segundo componente del sistema de generación de señales; en donde el primer y el segundo componente del sistema de generación de señales interactúan de tal manera que se crea una señal detectable cuando el primer y el segundo componente del sistema de generación de señales se colocan espacialmente próximos entre sí.

40 Preferentemente, el primer componente del sistema de generación de señales consiste en un agente quimioluminiscente y el segundo componente del sistema generador de señales consiste en un fotosensibilizador o viceversa. Un kit de prueba de este tipo es adecuado para medir la aglutinación mediante la medición de quimioluminiscencia.

45 En otra forma de ejecución del kit de prueba la heparina, el polisacárido no ramificado que se une a PF4, el polianión que se une a PF4 contenido en el primer reactivo o el complejo PF4-heparina contenido en el primer reactivo o el complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o un polianión se acopla a otra fase sólida particulada no celular, preferentemente a partículas de látex.

Los reactivos de un kit de prueba conforme a la invención se pueden proporcionar en forma líquida o liofilizada. En el caso de que algunos o todos los reactivos del kit de prueba estén disponibles como liofilizados, el kit de prueba

también puede contener adicionalmente los disolventes necesarios para disolver los liofilizados, como, por ejemplo, agua destilada o amortiguadores adecuados.

Los siguientes ejemplos tienen la función de ilustrar la presente invención y no se deben entender como una limitación.

## 5 EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Prueba de unión homogénea para la detección de anticuerpos anti complejo PF4-heparina

El reactivo 1 se obtuvo mezclando proteína PF4 aislada de concentrado de plaquetas humanas con heparina no fraccionada (UFH) en una proporción de 10 mg de proteína PF4: 0,2 U/ml (UFH) en una solución amortiguadora. Alternativamente, se utilizó un reactivo 1 que sólo contenía heparina no fraccionada (UFH) (0,2 U/ml).

- 10 Para la preparación del reactivo 2, se mezclaron aproximadamente 1 mg de proteína FcγRIIIa humana con 1 ml de partículas de látex de poliestireno (50 mg/ml, diámetro de partícula 0,2-0,3 μm) en una solución amortiguadora y se incubaron. Después de lavar las partículas varias veces, las partículas se resuspendieron en 50 ml de una solución amortiguadora.

- 15 Para conformar una mezcla de reacción se mezclaron 20 ml de una muestra de suero humano con 20 ml del reactivo 1 que contenía complejo PF4-heparina y 80 ml del reactivo 2 que contenía partículas de látex recubiertas con proteína FcγRIIIa y se incubaron a 37° C.

La densidad óptica (OD) de la mezcla de reacción se midió durante un período de 6 minutos a una longitud de onda de 570 nm en un dispositivo de análisis BCS XP (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH), y el resultado de la medición determinó el cambio medio en la densidad óptica por minuto (Delta OD/min).

- 20 Con la prueba de aglutinación conforme a la invención se midieron muestras de suero de 5 pacientes con HIT a los que se les diagnosticó HIT según criterios clínicos (puntuación 4T, en parte, con un evento trombótico) y fue determinada la presencia de anticuerpos del anti complejo PF4-heparina con dos inmunoensayos independientes disponibles en el mercado (HemosIL® AcuStar HIT-Ab (PF4-H), Instrumentation Laboratories y Asserachrom® HPIA-IgG, Diagnostica Stago).

- 25 Además, se midieron muestras de suero de 4 donantes sanos (que no presentaban criterios clínicos de HIT y tampoco anticuerpos del anti complejo PF4-heparina) y un lote de plasma normal (de aproximadamente 20 plasmas de donantes sanos, "FNP").

Como control negativo se utilizó un amortiguador.

- 30 En la tabla 1 están resumidos los resultados de la prueba. Se hace una distinción entre los resultados de las pruebas en las que se utilizó el reactivo 1 que contiene el complejo PF4-heparina (PF4/heparina) o el reactivo 1 que contiene sólo heparina (heparina).

Tabla 1: Resultados de la prueba de aglutinación conforme a la invención para el diagnóstico de HIT

	Pruebas ID	PF4-heparina delta OD/min [570 nm]	Delta de heparina OD / min [570 nm]
Donante sano	N 050	0,038	0,021
	N 048	0,026	0,025
	N 038	0,041	0,063
	N 001i	0,054	0,043
	FNP	0,025	0,027
	Control negativo	0,024	0,022

Pacientes HIT	175390366	0,462	0,212
	47288928	0,457	0,247
	175419732	0,493	0,531
	66793	0,344	0,271
	74850	0,269	0,408

5 Se ha demostrado que los resultados de ambas pruebas de aglutinación conforme a la invención permiten diferenciar entre donantes de sangre HIT-negativos sanos y pacientes HIT-positivos. En todas las mezclas de reacción que contienen muestras de pacientes con HIT, se puede medir una aglutinación significativamente mayor en comparación con donantes sanos. Como valor de corte (cut-off) para diferenciar muestras que contienen anticuerpos del anti complejo PF4-heparina de aquellas que no lo contienen se podría seleccionar un Delta OD/min [570 nm] de 0,1 en los dos sistemas de prueba disponibles.

Sin embargo, para una definición estadísticamente más precisa del valor de corte, se requiere un número significativamente mayor de mediciones de muestra.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección de anticuerpos anti complejo PF4-heparina en una muestra de fluido corporal; el procedimiento comprende los pasos:

i. Provisión de una mezcla de reacción mezclando la muestra

- 5
- con heparina o un polisacárido no ramificado que se une a PF4 o un polianión que se une a PF4; o
  - con el complejo PF4-heparina o con un complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o con un polianión; y
  - con una fase sólida de partículas no celulares; y

10 ii. Medición de la aglutinación de la fase sólida particulada no celular en la mezcla de reacción;

iii. Comparación de la aglutinación medida de este modo en la mezcla de reacción con un valor de referencia predeterminado para la aglutinación en mezclas de reacción que contienen muestras de fluidos corporales de donantes que se sabe que no contienen anticuerpos anti complejo PF4-heparina; y

15 iv. Determinación de la presencia de anticuerpos anti complejo PF4-heparina en la muestra cuando la aglutinación determinada en la mezcla de reacción supera el valor de referencia;

caracterizado porque,

la fase sólida particulada no celular está recubierta con proteína FcγRIIIa aislada.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde la aglutinación de la fase sólida particulada no celular en la mezcla de reacción se mide fotométricamente.

20 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en donde una primera fracción de la fase sólida particulada no celular está asociada con un primer componente de un sistema generador de señales y una segunda fracción de la fase sólida particulada no celular está asociada con un segundo componente del sistema generador de señales; y en donde el primer y el segundo componente del sistema de generación de señales interactúan de tal manera que se crea una señal detectable cuando el primer y segundo componente del sistema de generación de señales se colocan en proximidad espacial entre sí y la aglutinación de la fase sólida de partículas no celulares en la mezcla de reacción se mide en función de la señal creada.

4. Procedimiento según la reivindicación 3, en donde el primer componente del sistema generador de señales es un agente quimioluminiscente y el segundo componente del sistema generador de señales es un fotosensibilizador o viceversa y en donde se mide la quimioluminiscencia en la mezcla de reacción.

30 5. Procedimiento para el diagnóstico de una trombocitopenia inducida por heparina, en donde en una muestra de fluido corporal de un paciente se detecta la presencia de anticuerpos anti complejo PF4-heparina con un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Kit de prueba para la ejecución de un procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 5, que contiene los siguientes componentes:

- 35
- a. un primer reactivo que contiene heparina, un polisacárido no ramificado que se une a PF4 o un polianión que se une a PF4 o un complejo de PF4-heparina o un complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o con un polianión; y
  - b. un segundo reactivo que contiene una fase sólida particulada no celular que se recubre con proteína FcγRIIIa aislada.

40 7. Kit de prueba según la reivindicación 6, que además contiene el siguiente componente:

c. un tercer reactivo que contiene una fase sólida particulada no celular que está recubierta con proteína FcγRIIIa aislada;

en donde la fase sólida de partículas no celulares del segundo reactivo está asociada con un primer componente de un sistema generador de señales y la fase sólida de partículas no celulares del tercer reactivo está asociada con un segundo componente del sistema de generación de señales; y en donde el primer y el segundo componente del sistema de generación de señales interactúan de tal manera que se crea una señal detectable cuando el primer y el segundo componente del sistema de generación de señales se colocan espacialmente próximos entre sí.

5

8. Kit de prueba según la reivindicación 7, en donde el primer componente del sistema generador de señales es un agente quimioluminiscente y el segundo componente del sistema generador de señales es un fotosensibilizador o viceversa.

9. Kit de prueba según una de las reivindicaciones 6 a 8, en donde la fase sólida particulada no celular son partículas de látex.

10

10. Kit de prueba según una de las reivindicaciones 6 a 9, en donde la heparina, el polisacárido no ramificado que se une a PF4, el polianión que se une a PF4 contenido en el primer reactivo o el complejo PF4-heparina contenido en el primer reactivo o el complejo de PF4 con un polisacárido no ramificado o un polianión se acopla a otra fase sólida particulada no celular, preferentemente a partículas de látex.