



# ZYMUTEST® HIA MonoStrip IgGAM Screening-Test (# RK041D)

Qualitativer Screening-Test (ELISA) zum Nachweis Heparin-abhängiger Antikörper der IgG, IgM und IgA Isotypen

In-vitro-Diagnostikum

## HYPHEN BioMed

ZAC Neuville Université - 155, rue d'Eragny  
Tel. +33-1-34 40 65 10, Fax: +33-1-34 48 72 36  
95000 Neuville-sur-Oise - France | www.hyphe-biomed.com

Vertrieb in Deutschland: CoaChrom Diagnostica GmbH  
Tel. (kostenlos) 0800-24 66 33-0, Fax (kostenlos) 0800-24 66 33-3  
Vertrieb in Österreich: CoaChrom Diagnostica GmbH  
Tel. +43-1-699 97 97, Fax +43-1-699 18 97  
Stolzenthalg. 6, 1080 Wien | www.coachrom.com



Revision: 29/09/2009

### VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST® HIA MonoStrip, IgGAM ELISA-Kit ist ein qualitativer Screening-Test zur globalen Bestimmung Heparin-abhängiger Antikörper der IgG, IgA und IgM Isotypen in humanem Plasma, Serum und anderen biologischen Flüssigkeiten. Der Test ist zum Gebrauch als in-vitro-Diagnostikum bestimmt. Die Packung ist ausreichend für 4 Serien zu jeweils 8 Tests (z.B. in Doppelbestimmung: C+, C-, Probe und Leerwert) und ermöglicht so eine ökonomische Testung von Einzelproben.

### TESTPRINZIP:

Verdünntes Testplasma bzw. -serum oder andere verdünnte biologische Flüssigkeit wird mit Plättchenlysat (CLy) in die Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Bei Anwesenheit Heparin-abhängiger Antikörper vom IgG, IgA oder IgM Isotyp werden Komplexe mit, in der Mikrotiterplatte im Überschuss vorhandenem, UF-Heparin gebildet. Nach anschließendem Waschschritt, werden die gebundenen Antikörper mit einem Immunkonjugat bestehend aus 3 polyklonalen Antikörpern (Anti-Human IgG- (Fcγ-spezifisch), Anti-Human IgM- (μ-spezifisch), Anti-Human IgA- (α-spezifisch)) und Peroxidase (HRP) inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt wird das Peroxidasesubstrat Tetramethylbenzidin (TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hinzupipettiert, welches zur Blaufärbung des Testansatzes führt. Die Blaufärbung schlägt in eine Gelbfärbung um sobald die Reaktion durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt wird. Die Intensität dieser Färbung ist direkt proportional zur Menge der Heparin-abhängigen IgG, IgA und IgM Antikörper in der Probe.

### PROBENMATERIAL:

- Humanes Plasma mit Trinitriumcitrat oder EDTA als Antikoagulant
- Humanes Serum
- Jede andere biologische Flüssigkeit in denen Heparin-abhängige Antikörper vom IgG, IgA und IgM Isotyp vorhanden sein können.

### REAGENZEN:

1. **COAT: ELISA-Mikrotiterplatte**, enthält 4 Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen, beschichtet mit biologisch verfügbarem unfraktioniertem Heparin, gesättigt und stabilisiert. Die Streifen sind einzeln mit Trockenmittel in versiegelten Aluminiumbeuteln verpackt.
2. **SD:** 2 Flaschen mit je 12 ml HIA Probediluent, gebrauchsfertig. Enthält Natriumazid.
3. **C+:** 4 Flaschen HIA Positivkontrolle, lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit 0,5 ml HIA Probediluent (SD) erhält man die gebrauchsfertige Positivkontrolle (bereits 1:100 verdünnt). Die erwartete Reaktivität ist auf dem Datenblatt angegeben, welches der Testpackung beiliegt.
4. **C-:** 4 Flaschen Negativkontrolle, lyophilisiert (verdünntes humanes Normalplasma). Nach Rekonstitution mit 0,5 ml HIA Probediluent (SD) erhält man die gebrauchsfertige Negativkontrolle (bereits 1:100 verdünnt).
5. **CLy:** 4 Flaschen Zellylysat, lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit 0,5 ml Aqua dest. erhält man die gebrauchsfertige Lösung.
6. **IC:** 4 Flaschen Immunkonjugat (Anti-IgG (Fcγ)-IgM (μ)-IgA (α)-HRP-Immunkonjugat), HRP-gekoppelte Antikörper spezifisch für humanes IgG (Fcγ), IgM (μ), IgA (α), lyophilisiert. Nach Rekonstitution mit 2 ml Konjugatdiluent (CD) erhält man das gebrauchsfertige Immunkonjugat.
7. **CD:** 1 Flasche mit 10 ml Konjugatdiluent, gebrauchsfertig.
8. **WS:** 2 Flasche mit je 12 ml 20-fach konzentrierter Waschlösung.
9. **TMB:** 1 Flasche mit 10 ml Peroxidasesubstrat: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, enthält Wasserstoffperoxid, gebrauchsfertig.
10. **SA:** 1 Flasche mit 3 ml 0,45M Schwefelsäure (Stopplösung), gebrauchsfertig.

3. **Positivkontrolle (C+):** Um eine gebrauchsfertige Positivkontrolle zu erhalten, wird der Inhalt einer Flasche mit 0,5 ml HIA Probediluent (SD) rekonstituiert. Die Positivkontrolle entspricht einem Plasma, das Heparin-abhängige Antikörper der Isotypen IgG, IgM und IgA enthält und liegt nach Rekonstitution bereits als 1:100 Probenverdünnung vor. Die rekonstituierte Positivkontrolle ist, unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, 2 Wochen bei 2-8°C oder 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil.
4. **Negativkontrolle (C-):** Um eine gebrauchsfertige Negativkontrolle zu erhalten, wird der Inhalt einer Flasche mit 0,5 ml HIA Probediluent (SD) rekonstituiert. Die Negativkontrolle entspricht humanem Normalplasma und liegt nach Rekonstitution bereits als 1:100 Probenverdünnung vor. Die rekonstituierte Negativkontrolle ist, unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, 2 Wochen bei 2-8°C oder 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil.
5. **Zellylysat (CLy):** Um das gebrauchsfertige Reagenz zu erhalten, wird der Inhalt einer Flasche mit 0,5 ml Aqua dest. rekonstituiert. Das rekonstituierte Reagenz ist, unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, 2 Wochen bei 2-8°C oder 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil.

**Warnung:** Das bei der Testdurchführung verwendete CLy-Reagenz wird aus frischen humanen Plättchenkonzentraten gewonnen. Die Negativkontrolle wird ebenso aus humanem Plasma gewonnen, das mit registrierten Methoden getestet und als negativ für HIV-Antikörper, HBs-Ag und HCV-Antikörper eingestuft wurde. Kein Test kann jedoch die vollständige Abwesenheit infektiöser Stoffe ausschließen. Jedes Produkt humanen Ursprungs muss deshalb mit allen erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen als potenziell infektiös behandelt werden.

6. **Anti-IgG(Fcγ)-IgM(μ)-IgA(α)-HRP-Immunkonjugat (IC):** Jede Flasche wird mit 2 ml Konjugatdiluent rekonstituiert. Vor Gebrauch muss der Inhalt vollständig gelöst sein. Zur gleichmäßigen Durchmischung der Lösung ist die Flasche leicht zu schwenken. Das rekonstituierte Konjugat ist für mindestens 24 Stunden bei Raumtemperatur, 4 Wochen bei 2-8°C oder 2 Monate bei -20°C oder tiefer stabil.
7. **Konjugatdiluent (CD):** Gebrauchsfertig. Das geöffnete Reagenz ist, unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, 8 Wochen bei 2-8°C stabil. Das Reagenz enthält 0,05% Kathon CG.
8. **Waschlösung (WS):** Vorhandene Feststoffe sind durch Inkubation der Flasche für 15-30 Minuten bei 37°C im Wasserbad vollständig in Lösung zu bringen. Nach Durchmischung wird die erforderliche Menge 1:20 in Aqua dest. verdünnt (die in der Flasche enthaltenen 12 ml erlauben die Herstellung von 240 ml verdünnter Waschlösung). Die Waschlösung muss in der Originalflasche bei 2-8°C gelagert und innerhalb von 8 Wochen nach Öffnen verbraucht werden. Die verdünnte Waschlösung kann 7 Tagen, unter Vermeidung jeglicher bakteriellen Kontamination, verwendet werden. Das Reagenz enthält 0,05% Kathon CG.
9. **TMB-Substrat (TMB):** Gebrauchsfertig. Nach Öffnen kann das Reagenz, unter Vermeidung jeglicher bakteriellen Kontamination, 8 Wochen bei 2-8°C verwendet werden.
10. **Stopplösung (SA):** Gebrauchsfertig.

**Vorsichtsmaßnahmen:** Schwefelsäure ist auch in verdünnter Konzentration von 0,45M ätzend. Wie ähnliche chemische Substanzen muss Schwefelsäure mit größtmöglicher Vorsicht gehandhabt werden. Jeglicher Kontakt mit Augen und Haut ist zu vermeiden. Bei der Handhabung sind Schutzbürste und Handschuhe zu tragen.

**Anmerkungen:** Vor Gebrauch ist die Testpackung für mindestens 30 Minuten auf Raumtemperatur zu bringen. Ungeöffnete Reagenzien sind bei 2-8°C zu lagern.

Stabilitätsstudien bei 30°C zeigen, dass die Reagenzien ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur verschickt werden können.

Bei sachgemäßem Gebrauch und sachgemäßer Lagerung entsprechend der empfohlenen Durchführungsvorschriften und Vorsichtsmaßnahmen, kann die Testpackung bei Bedarf streifenweise innerhalb eines Zeitraumes von 2 Monaten benutzt werden.

### TESTDURCHFÜHRUNG:

#### Probengewinnung:

Blut (9 Volumenteile) wird in 0,109 M (oder 0,129 M) Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 2.500g wird der Plasmaüberstand abgenommen. Das Citratplasma sollte innerhalb von 24 Stunden verwendet oder bei -20°C oder tiefer eingefroren werden. Tiefgefrorenes Plasma kann bis zu 6 Monate gelagert und kurz vor Gebrauch für 15 Minuten bei 37°C aufgetaut werden. Aufgetaute Proben müssen innerhalb von 2 Stunden verwendet werden. Alternativ kann auch Na<sub>2</sub>-EDTA als Antikoagulant und Serum verwendet werden, Lagerung und Haltbarkeit entsprechen der von Citratplasma.

#### Proben- oder Kontrollplasma:

Die Proben werden 1:100 mit HIA Probediluent (SD) verdünnt. Falls sehr hohe Heparin-abhängiger Antikörper vorhanden sind, müssen diese in Verdünnungen von mindest 1:200 oder 1:400 getestet werden. Die Ergebnisse (Absorptionswerte A<sub>450</sub>) müssen in diesem Fall mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor (2 oder 4) multipliziert werden. Die Kontrollen liegen bereits gebrauchsfertig 1:100 verdünnt vor.

#### Durchführung:

Den Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen einlegen. Die Zugabe der Reagenzien in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen und die einzelnen Schritte der Testdurchführung erfolgen gemäß folgendem Pipettierschema:

**Anmerkung:** Es dürfen ausschließlich Komponenten aus derselben Packungscharge miteinander verwendet werden. Gemischte Komponenten aus unterschiedlichen Packungschargen dürfen für die Testdurchführung nicht verwendet werden.

### ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENHALTEN SIND:

- 8-Kanal-Pipette oder Multipette zur Abgabe von Volumina von 50-300 µl.
- Pipetten zur Abgabe von Volumina von 0-20 µl, 20-200 µl und 200-1000 µl.
- Waschgerät und Schüttler für Mikrotiterplatten.
- Lesegerät/Photometer für Mikrotiterplatten mit einer Wellenlängeneinstellung von 450 nm.
- Aqua dest.

### VORBEREITUNG DER REAGENZEN, LAGERUNG UND STABILITÄT:

In der Originalpackung bei 2-8°C gelagert, sind die ungeöffneten Reagenzien bis zum aufgedruckten Verfalldatum haltbar.

1. **ELISA-Mikrotiterplatte (COAT):** Den Aufbewahrungsbeutel öffnen und den Mikrotiterstreifen entnehmen. Dieser muss innerhalb von 30 Minuten nach Entnahme verwendet werden.
2. **HIA Probediluent (SD):** Gebrauchsfertig. Nach Öffnen kann das Reagenz für 8 Wochen bei 2-8 °C unter der Voraussetzung, dass jegliche bakterielle Kontamination vermieden wird, gelagert werden. Das Reagenz enthält Natriumazid.

**Warnung:** HIA Probediluent (SD) enthält Natriumazid, das mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren kann. Bei Entsorgung der Lösung in den Ausguss muss mit großen Mengen Wasser nachgespült werden.

Reagenz	Volumen	Durchführung
CLy	50 µl	CLy in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren (a)
Positivkontrolle oder Negativkontrolle oder 1:100 verdünnte Probe oder Probendiluent (Leerwert)	200 µl	– Positivkontrolle oder – Negativkontrolle oder – Verdünnte Probe oder – Probendiluent in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettieren (a)
<b>60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (b)</b>		
Waschlösung (20-fach in Aqua dest. verdünnt)	300 µl	5 aufeinanderfolgende Waschräume mit dem Wascherät durchführen (c).
Konjugat (anti-IgG (Fcγ)-IgM (µ)-IgA (α) HRP-Immunkonjugat, rekonstituiert mit 2 ml Konjugatdiluente)	200 µl	Das Immunkonjugat sofort nach dem Waschen in die Mikrotitervertiefungen pipettieren (c)
<b>60 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) inkubieren (b)</b>		
Waschlösung (20-fach in Aqua dest. verdünnt)	300 µl	5 aufeinanderfolgende Waschräume mit dem Wascherät durchführen (c).
TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Substrat	200 µl	Das Substrat sofort nach dem Waschen in die Mikrotitervertiefungen pipettieren. <b>Anmerkung:</b> Die Zugabe des Substrates muss, Reihe für Reihe, genau und in exakten Zeitintervallen durchgeführt werden (c,d)
Farbentwicklung für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25 °C) ablaufen lassen (b)		
0,45M Schwefelsäure	50 µl	In exakt den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe des Substrates die Farbentwicklung durch Zugabe von 0,45M Schwefelsäure abstoppen (c,d)
Nach 10 Minuten Wartezeit zur Stabilisierung die Absorption bei 450 nm (A <sub>450</sub> ) messen (e) und den Leerwert abziehen.		

#### Anmerkungen:

- Proben und Kontrollen sind so schnell wie möglich (innerhalb von 10 Minuten) in die Mikrotitervertiefungen zu pipettieren, um eine homogene immunologische Kinetik der Antikörperbindung zu gewährleisten. Eine zu lange Verzögerung zwischen der Abgabe in die erste und die letzte Mikrotitervertiefung kann die immunologische Kinetik beeinflussen und zu falschen Ergebnissen führen.
- Während der Inkubationsphasen, insbesondere während der Farbentwicklung, dürfen die Streifen nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden. Ein Mikrotiterplatten-Schüttler kann verwendet werden. Die Inkubationstemperatur muss im Bereich 18-25°C liegen. Die Ergebnisse werden durch zu hohe (>25°C) bzw. zu niedrige (<18°C) Temperaturen beeinflusst und die A<sub>450</sub>-Werte liegen dann dementsprechend zu hoch bzw. zu niedrig. Bei der Auswertung der Ergebnisse ist dies unbedingt zu berücksichtigen. Ein Mikrotiterplatten-Schüttler sollte nur am Beginn eines Inkubationsschrittes (Pipettieren der Proben, Zugabe Konjugat, Zugabe Substrat, Zugabe Stopplösung) für 1 bis 2 Minuten verwendet werden. Die A<sub>450</sub>-Werte sind signifikant erhöht, wenn die Mikrotiterplatte über den gesamten Inkubationszeitraum geschüttelt wird.
- Die Mikrotitervertiefungen dürfen zwischen der Zugabe einzelner Reagenzien oder nach einem Waschräume niemals vollständig austrocknen. Um das Austrocknen der Mikrotitervertiefungen und damit eine Beschädigung der immobilisierten Komponenten zu verhindern, muss das folgende Reagenz innerhalb der nächsten 3 Minuten zugegeben werden. Falls erforderlich, können die Mikrotitervertiefungen mit Waschlösung gefüllt verbleiben und erst kurz vor der Zugabe des folgenden Reagenz geleert werden. Die Einstellung des Wascherätes muss, um eine Verringerung der Reaktivität zu vermeiden, ein schonendes Waschen der Mikrotitervertiefungen ermöglichen.
- Bei der Zugabe des Substrates müssen die Zeitintervalle, Reihe für Reihe, genau festgelegt und exakt eingehalten werden. Dies gilt in gleicher Weise für die Zugabe der Stopplösung.
- Für eine bichromatische Ablesung können Referenzwellenlängen von 690 nm oder 620 nm verwendet werden.

#### QUALITÄTSKONTROLLE:

- Die in der Testpackung enthaltenen Kontrollen ermöglichen die Überprüfung der korrekten Durchführung des Testes.
- Die erwarteten A<sub>450</sub>-Werte der positiven bzw. negativen Kontrolle können Schwankungen von Charge zu Charge aufweisen. Bei Testdurchführung bei Raumtemperatur (18-25°C) liegen diese Werte allerdings immer wie folgt:

**P (Positivkontrolle C+): A<sub>450</sub> ≥ 1.0**

**N (Negativkontrolle C-): A<sub>450</sub> ≤ 0.30**

Die erwarteten Werte für die Positivkontrolle (P) und Negativkontrolle (N) bei 20±1°C sind auf dem Datenblatt angegeben, das der Testpackung beiliegt. Die gemessenen A<sub>450</sub>-Werte können entsprechend der tatsächlichen Temperatur bei der Testdurchführung schwanken.

#### ANGABE DER ERGEBNISSE:

- Die Ergebnisse werden entsprechend der A<sub>450</sub>-Werte als positiv oder negativ angegeben.
- Bei Verwendung höherer Probenverdünnungen ist der entsprechende Verdünnungsfaktor zu berücksichtigen.

#### INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Bei einer Testdurchführung bei 20±1°C gelten folgende Ergebnisbereiche:

**Positiv:** A<sub>450</sub> > 0.50  
**Negativ:** A<sub>450</sub> ≤ 0.50

**Anmerkung:** Wenn die Raumtemperatur bei der Testdurchführung außerhalb des empfohlenen Bereiches liegt, können die Absorptionswerte beeinflusst werden. In diesem Fall kann die Positivkontrolle zur Anpassung der Grenzwerte verwendet werden. Das Datenblatt, welches der Testpackung beiliegt, gibt den chargenspezifischen A<sub>450</sub>-Wert der Positivkontrolle und den A<sub>450</sub>-Wert in % der Positivkontrolle an, welche dem cut-off entspricht. Der ungerechnete Wert für den cut-off ist der entsprechende %-Wert der Absorption der Positivkontrolle in der jeweiligen Analysenserie.

#### EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

Durch ungenügende Ausführung der Waschräume kann es zu hohen Absorptionswerten der Negativkontrolle kommen. Wie bei allen Autoantikörpertesten kann es in klinischen Situationen wie entzündlichen Zuständen, infektiösen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen zu hohen Hintergrundsignalen kommen, die im Graubereich bzw. im schwach positiven Bereich liegen können. In diesem Fall ist eine spätere Probe auf die mögliche Anwesenheit von Antikörpern zu überprüfen. Fehlerhafte Ergebnisse können durch bakterielle Kontamination der Testmaterialien, unzureichende Inkubationszeiten, ungenügendes Waschen bzw. Entleeren der Mikrotitervertiefungen, Streulichtexposition des Substrates, Auslassung von Testreagenzien, Inkubation bei höheren oder niedrigeren als den vorgeschriebenen Temperaturen oder Auslassung von Testschritten entstehen. Die Ergebnisse dieses Testes sollten nicht als alleinige Grundlage für eine klinische Entscheidung herangezogen werden. Obwohl eine positive Reaktion in diesem Test ein Hinweis auf Heparin-induzierte Antikörper sein kann, ist ein positiver Nachweis dieser Antikörper noch KEINE BESTÄTIGUNG der Diagnose 'Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)'.  
Einige Patienten können natürlich vorkommende Antikörper gegen PF4 oder andere Chemokine aufweisen.

Einige Patienten können natürlich vorkommende Antikörper gegen PF4 oder andere Chemokine aufweisen.

#### PATHOLOGISCHE VARIATIONEN:

Heparin-abhängige Antikörper sind Immunglobuline, die im Plasma von Patienten mit Verdacht auf Heparin-Induzierte Thrombozytopenie (HIT), Typ II vorkommen. HIT, Typ II, die immunallergische Variante, tritt während einer Heparinbehandlung auf [1-2] und ist eine der wesentlichen Komplikationen dieser Therapie. Grundlage der Erkrankung ist die Entwicklung von Antikörpern gegen makromolekulare Heparin-Protein-(in der Regel Plättchenfaktor 4) Komplexe [3-4]. Neben Antikörpern gegen PF4-Heparin wurden in einigen Patienten auch Antikörper gegen andere Chemokine wie *Neutrophil-Activating Peptide* (NAP2) und Interleukin-8 (IL-8) nachgewiesen [5]. Die Entwicklung einer Pathologie ist im Wesentlichen mit Heparin-abhängigen Antikörpern vom IgG Isotyp assoziiert. Wenn der Test jedoch zur Bestimmung des Risikos zur Entwicklung einer klinischen Komplikation HIT eingesetzt wird, ist die Bestimmung der globalen IgGAM Isotypen als prognostischer Marker dieser Komplikation hilfreich. Nach dem ersten Auftreten einer HIT entwickeln sich entzündliche und/oder Plättchen-aktivierende Mechanismen, die mit unterschiedlichen medizinischen oder chirurgischen Zuständen assoziiert sind und zu einer erhöhten Freisetzung von Chemokinen führen bzw. die Bildung von Heparin-Komplexen mit Chemokinen (in der Regel PF4) begünstigen. Diese multimolekularen Komplexe können antigen werden und die Bildung Heparin-abhängiger Antikörper induzieren. Die Heterogenität dieser Antikörper könnte zumindest teilweise die Unterschiede zwischen dem klinischen Verdacht einer HIT und biologischen Testen [6] erklären. Oftmals bleiben Heparin-abhängige Antikörper asymptomatisch, im Speziellen Antikörper vom IgM Isotyp. Die klinische Assoziation ist bei hohen Antikörperkonzentrationen sowie dem IgG Isotyp höher.

#### ERGÄNZENDE TESTE:

Heparin-abhängige Antikörper vom IgG Isotyp zeigen höhere Assoziation zur klinischen Diagnose einer HIT. Der ZYMUTEST® HIA IgG (RK040A) oder ZYMUTEST® HIA MonoStrip IgG (RK041A) erzielt somit verbesserte Spezifität für die klinische Komplikation HIT-II, zeigt jedoch geringere Sensitivität, da Fälle, die ausschließlich mit Antikörpern von IgM bzw. IgA Isotyp assoziiert sind, nicht nachgewiesen werden.

#### ERGÄNZENDE CHARAKTERISIERUNG POSITIVER PROBEN (FALLS ERFORDERLICH):

Falls erforderlich, können positive Proben durch die Hemmung der Bindung in Gegenwart von Heparin weitergehend charakterisiert werden. Für diesen Bestätigungstest werden zu 500µl der 1:100 verdünnten Probe 10µl einer 100 IE/ml Lösung von unfraktioniertem Heparin zugegeben und homogen vermischt. Diese heparinisierte Probe (2 IU/ml Endkonzentration) wird dann als Probe im Test verwendet. Die Heparin-abhängige Bindung der Antikörper an die Mikrotiterplatte wird dadurch in nahezu allen Fällen gehemmt (Abnahme der A<sub>450</sub>-Werte um mehr als 50%). Diese Hemmung *bestätigt* die Heparin-abhängige Bindung der *Antikörper*. In sehr wenigen Proben, die bereits in Abwesenheit von Plättchenlysate positiv sind, wird diese Hemmung nicht beobachtet und der Test ergibt ohne oder mit Heparin in der verdünnten Probe ein positives Ergebnis: Dieses Resultat ist nach gegenwärtiger Kenntnis unklar und muss als nicht eindeutig erachtet werden. Zur Interpretation sind andere Tests und Kriterien für die Diagnose einer HIT zu berücksichtigen.

#### TESTSPEZIFITÄT UND -CHARAKTERISTIK:

Der ZYMUTEST® HIA IgGAM Testkit ist ein Screening-Test der alle Heparin-abhängigen Antikörper der IgG, IgM und IgA Isotypen global erfasst. Das optimierte Testsystem verwendet stabilisiertes, biologisch verfügbares, immobilisiertes Heparin und ermöglicht vollständige Reaktivität mit Heparin-bindenden Proteinen und Antikörpern. Diese zuverlässige Methode ermöglicht hohe Reproduzierbarkeit durch Identifizierung Heparin-abhängigen Antikörper aller Isotypen durch Nachahmung der Bindungsmechanismen der Antikörper in vivo an Heparine.

#### INTERFERENZEN:

Es tritt keine Beeinflussung durch Heparin bis zu 1 IU/ml auf.

#### LEISTUNGSMERKMALE:

Interne Studie: ZYMUTEST® IgGAM versus Asserachrom mit n=44 Proben:

		Asserachrom	
		Positiv	Negativ
ZYMUTEST IgGAM	Positiv	28	2
	Negativ	0	14
	Übereinstimmung	100%	88%

Externe Zwei-Zentren Studie: ZYMUTEST® IgGAM versus Asserachrom mit n=243 Proben:

		Asserachrom	
		Positiv	Negativ
ZYMUTEST IgGAM	Positiv	48	32
	Negativ	27	136
Übereinstimmung		76%	
Übereinstimmung, positiv		64%	
Übereinstimmung, negativ		81%	
Probenanzahl		243	

Externe Drei-Zentren Studie: ZYMUTEST® IgGAM versus GTI PF4 Enhanced mit n=345 Proben:

Kombination der 3 Zentren		GTI PF4 Enhanced	
		Positiv	Negativ
ZYMUTEST IgGAM	Positiv	101	17
	Negativ	74	153
Übereinstimmung		73,62%	
Übereinstimmung, positiv		57,71%	
Übereinstimmung, negativ		90,00%	
Probenanzahl		345	

Beispieldaten zur Reproduzierbarkeit:

Probe	Intra-Assay			Inter-Assay		
	N	A <sub>450</sub>	%VK	N	A <sub>450</sub>	%VK
IgGAM Positivkontrolle	9	1,74	4,75	7	1,84	7,50

#### REFERENZEN:

- Gruel Y. Thrombopénie induite par les héparines manifestations cliniques et physiopathologie. Presse Med. 1998; 27 :S7-S12.
- Warkentin TE, Levine MN, Hirsch J et al : Heparin induced thrombocytopenia in patient treated with low molecular weight heparin or unfractionated heparin. N eng J Med 1995; 332:1330-1335.
- Amiral J, Bridey F, Dreyfus M et al : Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparine induced thrombocytopenia : Thromb haemost. 1992, 68 : 95-96
- Amiral J, Bridey F, Wolf M et al : Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. Thromb Haemost 1995; 73: 21-28.
- Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M et al : presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin associated thrombocytopenia. Blood, 1996; 78:78-449 (abstract).
- Elalamy, Y Page, A Viallon, B Tardy, J Conard, G Helft : Diagnostic et gestion des thrombopénies induites par l'héparine. Rev Mal Respir, 1999, 16 : 961-974.
- Warkentin TE, Sheppard JA. Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Transfus Med Rev, 2006, 20:259-272.
- Greinacher A. Heparin induced thrombocytopenia: frequency and pathogenesis. Pathophysiol Haemost Thromb, 2006, 35:37-45.