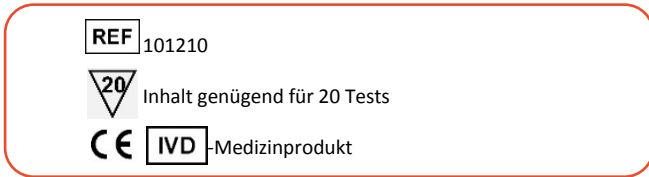


Emo-Test HIT Confirm®

Testkit für in-vitro-Diagnostikzwecke zur Bestätigung der heparininduzierten Thrombozytopenie durch die Messung der Thrombozyten-Aktivierung im Durchflusszytometer.



Diese Gebrauchsanweisung ist vor Verwendung sorgfältig zu lesen.

I. Verwendung und Testprinzip

Die heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine iatrogene, autoimmune Komplikation durch die Verabreichung von Heparin (unfraktioniert und mit niedrigem Molekulargewicht). Sie manifestiert sich durch eine starke Thrombozyten-Aktivierung, die häufig mit Thrombosen einhergeht. Die HIT wird durch die Generation von Antikörpern verursacht, die gegen PF4:Heparin-Komplexe gerichtet sind. Wenn niedrige (0,1 bis 1 IE/mL), nicht aber wenn hohe Heparinkonzentrationen (10 bis 100 IE/mL) vorliegen, aktivieren diese Antikörper Thrombozyten, indem sie an Thrombozyten-Fc-Rezeptoren binden.

HIT Confirm® unterstützt zusammen mit der Konzentration der Antikörper gegen den PF4:Heparin-Komplex im Plasma die Labordiagnose von HIT. **HIT Confirm®** ist ein einstufiger Durchflusszytometer-Schnelltest. Er ermöglicht die Quantifizierung der Plättchen-Aktivierung anhand von zwei Oberflächenmarkern – einem Plättchenmarker, CD41, und einem Plättchen-Aktivierungsmarker, CD62, nachdem die Patientenprobe (menschliches Plasma oder Serum) mit HIT-Verdacht in 2 Heparinkonzentrationen inkubiert wurde: einer schwachen (0,3 IE/mL) und einer starken Konzentration (100 IE/mL) (Abbildung 1).

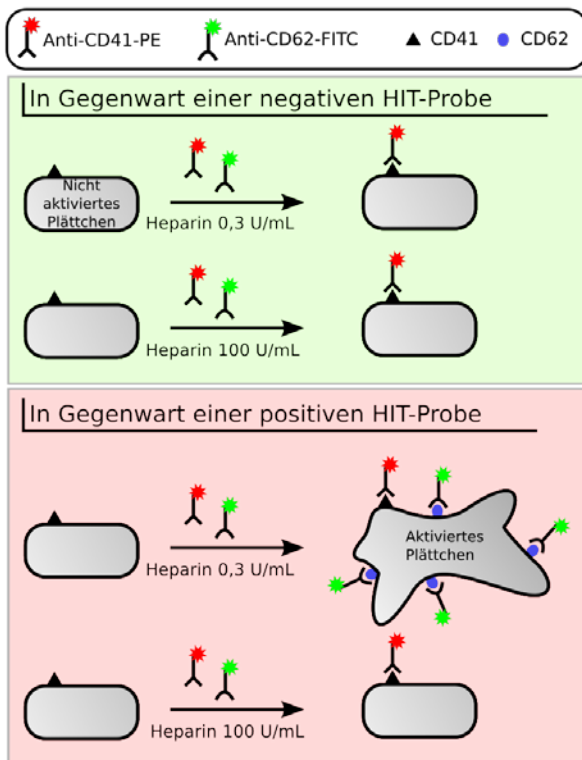


Abbildung 1: Zusammenfassung der Methode HIT Confirm®

II. Material

II.1. Im Kit enthaltene Reagenzien

Reagenz	Menge
A Verdünnungspuffer	50 mL
B Anti-CD41-PE	100 µL
C Anti-CD62-FITC	100 µL
D Heparin 3 E/mL	250 µL
E Heparin 1.000 E/mL	250 µL
F TRAP	50 µg

Jeder Testkit enthält die zur Durchführung von 20 separaten Tests erforderliche Menge an Reagenzien. Der Test kann in weniger als einer Stunde durchgeführt werden. Die in der oben stehenden Tabelle angegebenen Farbcodes entsprechen den Etiketten und Verschlüssen.

II.2. Nicht enthaltene, erforderliche Materialien

- Frische Thrombozytensuspension (PRP < 3 Stunden alt)
- Laborzentrifuge
- Für die Durchflusszytometrie (je nach Zytometer) geeignete Röhrchen oder Platten
- Destilliertes Wasser
- Mikropipetten und entsprechende Spitzen
- Vortex
- Stoppuhr
- Schüttler
- Zur Messung der von Phycoerythrin (PE) und Fluoresceinisothiocyanat (FITC) emittierten Fluoreszenz geeignetes Durchflusszytometer

III. Wichtige Hinweise

III.1. Vorsichtsmaßnahmen

Den Test nur von zugelassenem und geschultem Personal durchführen lassen. Das Durchflusszytometer muss von einer qualifizierten Fachkraft bedient werden. Die Interpretation der Ergebnisse muss von Personal durchgeführt werden, das über Kompetenzen in der Auslegung von Durchflusszytometerdaten verfügt.

Das Zytometer in Übereinstimmung mit den Herstelleranweisungen in Stand halten. Es müssen regelmäßig Kontrollmessungen durchgeführt werden.

Die Vorgaben der Guten Laborpraxis (GLP) sind zu beachten. Den lokalen Entsorgungsrichtlinien ist Folge zu leisten. Biologisches Material (Blut, Plasma, Serum) muss als potenziell infektiös behandelt werden, entsprechende Schutzausrüstung ist zu tragen.

Die Thrombozytensuspensionen (nicht enthalten) zwischen 20 und 25 °C unter fortlaufendem, leichtem Rühren lagern. Die Suspensionen innerhalb von **maximal 3 Stunden** verwenden. Die verwendeten Thrombozyten (nicht enthalten) müssen von einem gesunden Spender stammen, der mindestens 7 Tage vor der Blutabnahme keine Thrombozytenaggregationshemmer wie Aspirin, Entzündungshemmer oder Vitamin C eingenommen hat.

Es dürfen niemals Reagenzien aus einem anderen Testkit verwendet werden.

Ist ein Testkit beschädigt, ist der Hersteller oder Vertriebs Händler zu kontaktieren.

III.2. Lagerung

Ungeöffnete Testkits sind zwischen 2 und 8 °C zu lagern. Unter diesen Bedingungen sind die Reagenzien bis zu dem auf der Verpackung angegebenen Ablaufdatum stabil.

Die Reagenzien A, B, C, D und E sind gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen der Fläschchen sind sie für 2 Monate stabil, sofern sie zwischen 2 und 8 °C und vor Kontaminationen geschützt gelagert werden. Die Reagenzien B und C sind lichtempfindlich.

Nach Rekonstitution ist das Reagenz F für 2 Monate stabil, sofern es zwischen 2 und 8 °C und vor Kontaminationen geschützt gelagert wird.

Nach jeder Verwendung müssen die Reagenzien umgehend zurück in die Packung gegeben werden und bei einer Temperatur zwischen 2 und 8 °C und vor Sonneneinwirkung geschützt gelagert werden.

IV. Vorbereitende Arbeitsschritte

IV.1. Rekonstitution

Das Reagenz F ist vor der ersten Verwendung mit 50 µL destilliertem Wasser (nicht enthalten) zu rekonstituieren und für 1 Minute mithilfe eines Vortex-Schüttlers zu homogenisieren.

IV.2. Einstellungen des Zytometers

Die Einstellungen des Zytometers werden bei jeder Verwendung eines neuen Zytometers angepasst. Dann können sie für anschließende Tests mit demselben Instrument wiederverwendet werden. Die vom Hersteller mitgelieferte Bedienungsanleitung des Geräts ist zu beachten.

1. Die Kompensationen für die spektralen Überlappungen des FITC-Kanals im PE-Kanal und umgekehrt ermitteln.
2. Eine Schwelle auswählen, mit der die Thrombozytenpopulation ohne Rückstände dargestellt werden kann. Es wird empfohlen, den Schwellparameter auf FSC festzulegen (Differenzierung nach Volumen).
3. Falls zutreffend, die Spannung der Photomultiplier (PMT) anpassen – üblicherweise nach SSC und für die Fluoreszenzkanäle, hier FITC und PE.
4. Die Durchflussgeschwindigkeit anpassen, um Ereigniszufälle zu vermeiden. In der Regel sollte ein Durchsatz von über 1.000 Ereignissen/Sek. vermieden werden.

Beispiel: Die Einstellungen für das Durchflusszytometer Becton Dickinson FACSVia™ lauten: 1. FL1- 2,2 % FL2- 17 % FL1; 2. Schwelle FSC 50.000; 3. Nicht anwendbar; 4. Langsam.

IV.3. Auswahl der Thrombozytenspender

Im Testkit sind keine Thrombozyten enthalten. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, Proben von gesunden Spendern zu beziehen. Es wird empfohlen, die Thrombozyten-Proben mit Blut aus einem Transfusionszentrum herzustellen (siehe III.1. Vorsichtsmaßnahmen). Da jede Thrombozytensuspension einzigartig ist (Homogenität, Nummerierung, Haltbarkeit und Reaktivität), wird empfohlen zunächst zu prüfen, ob die Thrombozyten ordnungsgemäß mit einer HIT-positiven Plasma- oder Serumprobe (nicht im Testkit enthalten) als positive Reaktivitätskontrolle aktiviert wurden.

Hinweis: Thrombozyten aus verschiedenen Blutentnahmen dürfen nicht gemischt werden (auch nicht bei identischem Spender).

IV.4. Vorbereitung biologischer Proben

Der Test ist zur Analyse von menschlichem Plasma oder Serum vorgesehen. Die Probe mit Citrat-Vollblut (Plasma) oder mit der Ausschussentnahme (Serum) durch Zentrifugation vorbereiten: 2.000 g, 10 Minuten, zwischen 20 und 25 °C. Der Test kann mit frischem oder bei -80 °C konserviertem und dann auf eine Temperatur von 37 °C gebrachtem Plasma oder Serum durchgeführt werden. Es wird empfohlen, die Proben vor der Verwendung auf 0,2 µm zu filtern, um eine

artefaktische Aktivierung der Thrombozyten durch Verunreinigungen zu verhindern.

V. Methodik

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung eine Temperatur zwischen 20 und 25 °C erreicht haben.

V.1. Vorbereitung des thrombozytenreichen Plasmas

Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulant (1 Volumenteil) abgenommen

Das thrombozytenreiche Plasma (PRP) wird aus Citrat-Vollblut (1 Volumenteil Antikoagulant zu 9 Volumenteilen Blut) eines gesunden Spenders gewonnen. Die ersten 3–4 mL Blut sind in einem separaten Röhrchen zu sammeln und zu werfen. Das Blut anschließend in einem neuen Röhrchen sammeln. Das Blut nach der Entnahme für mindestens 30 Minuten bei 20 bis 25 °C ruhen lassen, anschließend das PRP durch Zentrifugation herstellen: 200 g, 5 Minuten, zwischen 20 und 25 °C, ohne Bremse. Die Thrombozyten können im Vollblut für maximal 6 Stunden aufbewahrt werden. Den Überstand der Zentrifugation vorsichtig in ein Röhrchen aus Polypropylen geben und zwischen 20 und 25 °C unter fortlaufendem leichtem Rühren (10 U/min) lagern. Die Proben müssen am Zytometer innerhalb von 3 Stunden nach Beginn der Zentrifugation abgelesen werden.

Hinweis: Zur Vermeidung einer artefaktischen Aktivierung der Thrombozyten deren Manipulation auf ein Mindestmaß reduzieren. Niemals eine Thrombozytensuspension durch Vortex mischen. Vor jeder Entnahme das Röhrchen vorsichtig manuell schwenken, um die Zellen erneut zu suspendieren.

V.2. Immunmarkierung

Verfahren für eine Probe:

Die Ausgangsmischung (AM)* besteht aus:			
A	115 µL Verdünnungspuffer	*Siehe Tabelle 1 für eine Volumen Anpassung gemäß der Anzahl der zu testenden Stichproben	
B	5 µL Anti-CD41-PE		
C	5 µL Anti-CD62-FITC		
(nicht ent.)	50 µL PRP		

Vorsichtig homogenisieren

4 Röhrchen vorbereiten:

2 Kontrollröhrchen

Negativ (Neg)		Positiv (Pos)	
AM	35 µL Ausgangsmischung	AM	35 µL Ausgangsmischung
A	15 µL Verdünnungspuffer	A	15 µL Verdünnungspuffer
		F	2 µL TRAP

2 Röhrchen für Proben

Heparin 3 (H0,3)		Heparin 1000 (H100)	
AM	35 µL Ausgangsmischung	AM	35 µL Ausgangsmischung
D	5 µL Heparin 3 U/mL	E	5 µL Heparin 1000 U/mL
(nicht ent.)	10 µL Probe	(nicht ent.)	10 µL Probe

Die 4 Röhrchen 30 Minuten zwischen 20 und 25 °C unter leichtem Schwenken und vor Sonnenlicht geschützt inkubieren

450 µl des Verdünnungspuffers zu den 4 Röhrchen hinzufügen und sofort die Daten des Zytometers erfassen: 10.000 Ereignisse

* Die Ausgangsmischung (AM) muss gemäß unten stehender Tabelle an die Anzahl der zu testenden Proben angepasst werden. Für mehrere gleichzeitige Tests sind eine negative und eine positive Kontrolle ausreichend. Es wird jedoch

davon abgeraten, mehr als 5 Proben (insgesamt 12 Röhrcchen) gleichzeitig zu analysieren.

$$\%HEPLA = \frac{\%R_{H0,3} - \%R_{H100}}{\%R_{Pos} - \%R_{Neg}} * 100$$

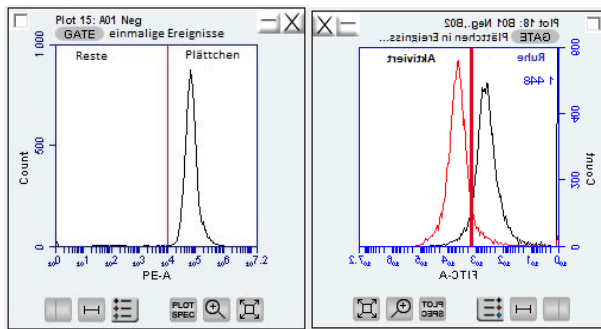
Anzahl der Proben	A	Verdünnungs-puffer	B	Anti-CD41-PE	C	Anti-CD62-FITC	PRP
1		115 µL		5 µL		5 µL	50 µL
2		161 µL		7 µL		7 µL	70 µL
3		207 µL		9 µL		9 µL	90 µL
4		253 µL		11 µL		11 µL	110 µL
5		299 µL		13 µL		13 µL	130 µL

Tabelle 1: Volumen Anpassung der Ausgangsmischung für 1 bis 5 Probe(n).

V.3. Analyse und Interpretation der Ergebnisse

Hinweis: Alle hier angegebenen Ergebnisse wurden mit einem Durchflusszytometer FACS Via™ (Becton Dickinson) ermittelt.

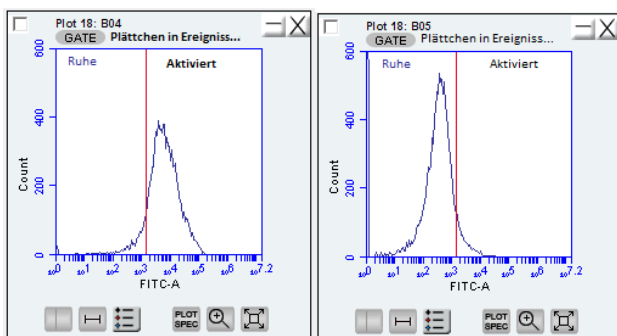
- Die Thrombozytenpopulation mit dem Neg-Röhrcchen (PE+ Ereignisse) identifizieren. Beispiel: Auf dem Zytogramm 1 ist die Thrombozytenpopulation durch eine vertikale Markierung abgegrenzt.



Zytogramm 1

Zytogramm 2:
Neg. schwarz, Pos. rot.

- Die Thrombozytenpopulationen (PE+) Neg und Pos auf einem FITC-Histogramm übereinanderlegen. Eine vertikale Markierung am Schnittpunkt beider Kurven setzen (Zytogramm 2: negativ in schwarz und positiv in rot). Die Thrombozyten rechts von dieser Markierung (Aktivierungsschwelle) gelten als aktiviert (PE+/FITC+).
- Die Prozentsätze der Werte rechts von der Aktivierungsschwelle (%R) notieren. Im Beispiel: %R Neg = 7,2 % und %R Pos = 90,3 %.
- Die FITC-Zytogramme der Röhrcchen H0,3 und H100 visualisieren und die zuvor gesetzte vertikale Markierung anwenden. Die %R-Werte notieren. Im gezeigten Beispiel ist %R H0,3 = 86,8 % und %R H100 = 7,4 % (s. Zytogramm 3 und Zytogramm 4).



Zytogramm 3: Röhrcchen H0,3

Zytogramm 4: Röhrcchen H100

Für eine Plasma- oder Serumprobe wird der Index der heparininduzierten Thrombozyten-Aktivierung (HIPA) mithilfe von %R nach folgender Formel berechnet:

%HEPLA	ERGEBNIS	SPEZIFITÄT
< 9,6 %	Negativ	N/A
Von 9,6 % bis 13,0 %	Nicht eindeutig*	≥ 94,9 %
> 13,0 %	Positiv	≥ 96,5 %

* Es wird empfohlen, den Test mit dem PRP eines anderen gesunden Spenders zu wiederholen.

VI. Leistung

Kontrollreferenzwerte (N=25):

Kontrollwert	%R (Mittelwert +/- SD)	Zulässiger Wert* (%R)
Positiv	91,5 % ± 3,3 %	> 84,9 %
Negativ	8,4 % +/- 5,5 %	< 19,3 %

* Diese Werte entsprechen dem Mittelwert +/- 2 SD. Wenn diese Werte nicht erreicht werden, muss der Test wiederholt werden.

Die Nachweisgrenze des Tests in %HEPLA beträgt 3,9 % und der Linearitätsbereich des Tests beträgt 11,7 % bis 61,5 % (r² = 0,99 und Verzerrung <10 %).

Wiederholbarkeit (Intra-Assay N=10):

	Stark positives Plasma	Moderat positives Plasma	Normales Plasma
%HEPLA:			
Mittelwert ± SD,	94,1 % ± 0,9 %,	27,9 % ± 2,7 %,	<3,9 % (LOD) N/A
%CV	0,9 %	9,8 %	

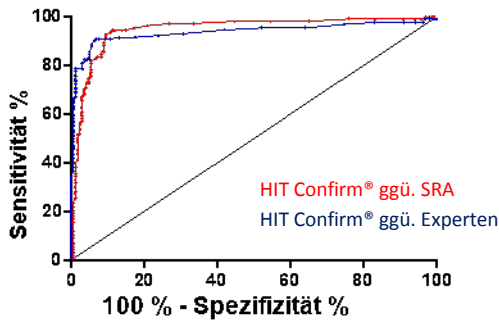
Reproduzierbarkeit (Inter-Assay N=11):

%HEPLA: Mittelwert ± SD, %CV	Stark positives Plasma	Moderat positives Plasma	Normales Plasma
Intra-PRP	61,5 % ± 7,1 %, 11,5 %	27,6 % ± 3,4 %, 12,4 %	<3,9 % (LOD)
Intra-Spender	69,6 % ± 5,8 %, 8,4 %	32,9 % ± 6,9 %, 20,9 %	<3,9 % (LOD)
Inter-Spender	69,5 % ± 4,1 %, 6,0 %	26,6 % ± 11,9 %, 44,8 %	<3,9 % (LOD)

Testevaluation bei gesunden Spendern: Es wurden 57 Messungen mit dem Plasma gesunder Spender durchgeführt (N=42, PRP N=9).

Messung	Mittelwert	Mittelwert + 1 SD	Mittelwert + 2 SD	Mittelwert + 3 SD
%HEPLA	2,8 %	6,2 %	9,6 %	13,0 %

Testevaluation bei Patienten mit Verdacht auf HIT¹: Es wurden 290 Plasmaproben getestet. Davon wurden von einer Expertengruppe 131 als positiv und 159 als negativ erachtet. Parallel dazu wurden alle Plasmaproben mit einem Serotoninfreisetzungstest mit radioaktiv markiertem Serotonin (SRA) untersucht.



	Sensitivität [95 % CI]	Spezifität [95 % CI]
SRA vs Experts	80 % [73-87 %]	94 % [90-97 %]
HIT Confirm® vs Experts	90 % [85-95 %]	94 % [90-97 %]

VII. Einschränkungen der Methode

Da im Testkit keine Thrombozyten enthalten sind, ist jedes Labor dafür verantwortlich, gesunde Spender mit reaktiven Thrombozyten zu finden. Es wird empfohlen, eine HIT-positive Probe einzuschließen, wenn eine neue Thrombozytencharge verwendet wird.

Die Präzision der Zytometriemethode ist von der Verwendung eines gemäß den Empfehlungen des Herstellers richtig eingestellten, gewarteten und geprüften Zytometriegeräts abhängig. Diese Methode wurde auf einem FACSVia™ von Becton Dickinson validiert.

VIII. Referenzen:








¹ A standardized functional assay for routine reliable hit diagnosis: a potential alternative to the serotonin release assay. Mündliche Kommunikation, ISTH 2017: Dr Brigitte Tardy, Laboratoire Sainbiose DVH-Hämostase, St Etienne, Frankreich.

IX. Eingetragenes Markenzeichen

HIT Confirm® ist ein eingetragenes und geschütztes Markenzeichen von Emosis SAS, Frankreich. Eine Vervielfältigung oder Verwendung dieses Markenzeichens ohne die ausdrückliche Genehmigung von Emosis SAS ist gemäß der Artikel L713-2 ff des French Intellectual Property Code untersagt.

HIT Confirm® verwendet eine von Emosis SAS patentierte Technologie.

X. Symbole

-  Gebrauchsanweisung beachten,  Bestellnummer,
-  Inhalt genügend für 20 Tests,  In-vitro-Diagnostikum,
-  Temperaturbegrenzung (°C),  Verwendbar bis,
-  CE-Kennzeichnung

XI. Zusammenfassung des Tests

