Der Inhalt dieses Dokuments dient lediglich als Beispiel. Die aktuellste Version finden Sie in unserem geschützten Downloadbereich unter https://www.coachrom.com/insert. Bei Bedarf senden wir sie Ihnen aber auch gerne zu, bitte anfordern unter: info@coachrom.com

CE

IVD

ZYMUTEST™ HIA IgG

Art.Nr. RK040A

HYPHEN BioMed

Vertrieb und Support:
CoaChrom Diagnostica GmbH
www.coachrom.com | info@coachrom.com
Tel. +43-1-236 222 1 | Fax +43-1-236 222 111
Kostenfreie Nummern für Deutschland:
Tel. 0800-24 66 33-0 | Fax 0800-24 66 33-3

ELISA-Kit zum qualitativen Nachweis Heparin- bzw. Protaminsulfat-abhängiger Antikörper vom IgG-Isotyp

VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST™ HIA IgG ist ein Enzymimmunoassay zum qualitativen Nachweis Heparin-abhängiger Antikörper vom IgG-Isotyp in humanem Plasma, Serum oder anderen biologischen Flüssigkeiten.

ZUSAMMENFASSUNG:

Der ZYMUTEST™ HIA IgG verwendet eine stabilisierte Beschichtung aus einem Überschuss an biologisch verfügbarem, unfraktioniertem Heparin. Somit erlaubt er volle Reaktivität mit Heparin-abhängigen Antikörpern vom IgG-Isotyp. Dieses optimierte Testsystem ermöglicht hohe Reproduzierbarkeit durch Identifizierung Heparin-abhängiger Antikörper vom IgG-Isotyp, indem die *in vivo*-Bindungsmechanismen dieser Antikörper an Protein:Heparin- bzw. Plättchenfaktor 4:Heparin-Komplexe nachgeahmt werden.

TESTPRINZIP:

Die verdünnte Probe (humanes Plasma, Serum oder andere biologische Flüssigkeiten) wird zusammen mit einem Plättchenlysat in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert, die mit einem Überschuss an unfraktioniertem Heparin beschichtet sind. Unter Nachahmung der Abläufe, die sich *in vivo* abspielen, komplexieren in der Probe bzw. im Plättchenlysat enthaltene Chemokine wie Plättchenfaktor 4 (PF4) mit diesem Heparin. Nach einem ersten Waschschritt erfolgt die Zugabe eines Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten polyklonalen Antikörpers, der für das humane Fcγ-Fragment und folglich für humane Antikörper vom IgG-Isotyp spezifisch ist. Nach einem zweiten Waschschritt wird das Peroxidasesubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zugegeben. Unter diesen Bedingungen färbt sich TMB blau und schlägt beim Stoppen der Reaktion mit Schwefelsäure nach gelb um. Die Farbentwicklung ist direkt proportional zum Titer Heparin-abhängiger Antikörper vom IgG-Isotyp in der Probe.

IM KIT ENTHALTENE KOMPONENTEN:

1. **COAT: ELISA-Mikrotiterplatte,** bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, mit einer stabilisierten Beschichtung aus einem Überschuss an biologisch verfügbarem, unfraktioniertem Heparin. Die Platte ist mit einem Trockenmittel luftdicht in einem Aluminiumbeutel verpackt.
2. **SD**: 2 Flaschen mit je 50 mL **HIA Probenverdünner**, gebrauchsfertig. Enthält Natriumazid.
3. **C+**: 3 Flaschen **HIA IgG Positivkontrolle**, lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit **1,0 mL** HIA Probenverdünner (SD) erhält man eine **1:100 vorverdünnte** Positivkontrolle.
4. **C-**: 3 Flaschen **Negativkontrolle** (humanes Normalplasma), lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit **1,0 mL** HIA Probenverdünner (SD) erhält man eine **1:100 vorverdünnte** Negativkontrolle. Enthält BSA.

Anmerkung: Die erwarteten Reaktivitäten der HIA IgG Positivkontrolle (C+) und der Negativkontrolle (C-) variieren von Charge zu Charge. Sie werden auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, angeführt.

5. **CLy**: 3 Flaschen **Plättchenlysat**, lyophilisiert, enthält humanes Normalplasma. Durch Rekonstitution mit **2,0 mL** aqua dest. erhält man eine gebrauchsfertige Lösung. Enthält BSA.
6. **IC**: 3 Flaschen **Anti-(h)-IgG Fcγ-HRP-Immunkonjugat**. Polyklonaler Antikörper, spezifisch für das humane Fcγ-Fragment, gekoppelt an Meerrettichperoxidase (HRP), lyophilisiert. Mit 7,5 mL Konjugatverdünner (**CD**) zu rekonstituieren. Enthält BSA.
7. **CD**: 1 Flasche mit 25 mL **Konjugatverdünner**, gebrauchsfertig. Enthält BSA.
8. **WS**: 1 Flasche mit 50 mL 20-fach konzentrierter **Waschlösung**.
9. **TMB**: 1 Flasche mit 25 mL **Peroxidasesubstrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)**, versetzt mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2), gebrauchsfertig.
10. **SA**: 1 Flasche mit 6 mL **Stopplösung (0,45 M Schwefelsäure)**, gebrauchsfertig.

Das Reagenz SD enthält Natriumazid in geringer Konzentration (0,9 g/L), das Reagenz SA enthält Schwefelsäure. Die unten aufgeführten Warnhinweise sind zu beachten.

ANMERKUNGEN UND WARNHINWEISE:

- Alle Produkte biologischen Ursprungs müssen mit den erforderlichen Vorsichtsmaßnahmen und als potentiell infektiös behandelt werden.
- Natriumazid kann mit Blei- bzw. Kupferarmaturen unter Bildung hochexplosiver Metallazide reagieren.
- Falls das TMB-Substrat eine Gelbfärbung aufweist, ist dies ein Zeichen von Kontamination. Die betroffene Flasche ist zu verwerfen und eine neue Flasche zu verwenden.
- Bei der Entsorgung sind die lokalen Entsorgungsrichtlinien zu befolgen.
- Nur Reagenzien aus Packungen mit identischer Chargennummer verwenden. Die Kombination der Reagenzien ist in Bezug auf die jeweilige Charge optimiert.
- Die Reagenzien sind sorgfältig zu behandeln, um jegliche Kontamination während der Verwendung zu vermeiden. Um Verdunstung der Reagenzien während der Verwendung soweit wie möglich zu vermeiden, ist die Verdunstungsoberfläche so gering wie möglich zu halten. Verdunstung verringert die Reagenzstabilität in Analysenautomaten.
- Um die Stabilität zu gewährleisten, müssen die Reagenzflaschen nach jedem Gebrauch mit der Original-Schraubkappe verschlossen werden.
- Stabilitätsstudien für 3 Wochen bei 30°C haben gezeigt, dass die Packungen ohne Beeinträchtigung bei Raumtemperatur versendet werden können.
- Das zur Herstellung des BSA verwendete bovine Plasma wurde auf die Abwesenheit infektiöser Substanzen getestet und aus BSE-freien Tieren gewonnen.
- Schwefelsäure ist, auch bei einer 0.45M-Verdünnung, ätzend. Wie ähnliche Chemikalien muss Schwefelsäure mit höchster Vorsicht behandelt werden. Beim Umgang mit Schwefelsäure sind Schutzbrille und Handschuhe zu tragen, um Haut- und Augenkontakt zu vermeiden.
- Zur *In-vitro*-Diagnostik.

CD, WS: H317: Kann allergische Hautreaktionen hervorrufen.

VORBEREITUNG UND STABILITÄT DER REAGENZIEN:

Die erforderlichen Testkitkomponenten müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf Raumtemperatur (18-25°C) gebracht werden. Nicht benötigte Komponenten sind bei 2-8°C zu lagern. Die Flaschen sind unter Vakuum verschlossen. Bei den lyophilisierten Reagenzien sind die Gummistopfen vorsichtig zu öffnen, um einen Verlust an Reagenz zu vermeiden. Bei angemessener Verwendung und Lagerung unter Beachtung der empfohlenen Anweisungen und Warnhinweise kann das Kit innerhalb von zwei Monaten und wenn nötig streifenweise verwendet werden.

1. **COAT (ELISA-Mikrotiterplatte):** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Nach Entnahme aus dem Beutel müssen die Streifen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Zur Lagerung werden nicht benötigte Streifen in Gegenwart des Trockenmittels im originalen Aluminiumbeutel hermetisch und vor Feuchtigkeit geschützt verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Unter diesen Bedingungen sind die Streifen **8 Wochen bei 2-8°C** haltbar.
2. **SD (HIA Probenverdünner):** Gebrauchsfertig, enthält Natriumazid. Nach dem Öffnen kann die Lösung in der Originalflasche unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung **8 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
3. **C+ (HIA IgG Positivkontrolle):** Den Inhalt der Flasche mit **1,0 mL HIA Probenverdünner (SD)** rekonstituieren und gründlich bis zur vollständigen Auflösung durchmischen. Somit erhält man eine **1:100 vorverdünnte** Positivkontrolle, die einem Plasma entspricht, das Heparin-abhängige Antikörper vom IgG-Isotyp enthält. Unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung ist die rekonstituierte Positivkontrolle in der Originalflasche **2 Wochen bei 2-8°C** und **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.
4. **C- (Negativkontrolle):** Den Inhalt der Flasche mit **1,0 mL HIA Probenverdünner (SD)** rekonstituieren und gründlich bis zur vollständigen Auflösung durchmischen. Somit erhält man eine **1:100 vorverdünnte** Negativkontrolle, die humanem Normalplasma entspricht. Unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung ist die rekonstituierte Negativkontrolle in der Originalflasche **2 Wochen bei 2-8°C** und **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.
5. **CLy (Plättchenlysat):** Den Inhalt der Flasche mit **2,0 mL** aqua dest. rekonstituieren und gründlich bis zur vollständigen Auflösung durchmischen. Unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung ist das rekonstituierte Plättchenlysat in der Originalflasche **2 Wochen bei 2-8°C** und **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.
6. **IC (Anti-(h)-IgG Fcγ-HRP-Immunkonjugat):** Den Inhalt der Flasche mindestens 15 Minuten vor der Verwendung mit **7,5 mL** Konjugatverdünner (CD) rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung vorsichtig durchmischen. Unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung ist das rekonstituierte Immunkonjugat in der Originalflasche **24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C)**, **4 Wochen bei 2-8°C** und **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.
7. **CD (Konjugatverdünner):** Gebrauchsfertig, enthält 0,05% Kathon CG Nach dem Öffnen kann die Lösung unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung in der Originalflasche **8 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
8. **WS (Waschlösung):** Wenn nötig im Wasserbad **bei 37°C** bis zur vollständigen Auflösung von Feststoffen inkubieren. Durchmischen und das für die Testreihe erforderliche Volumen **1:20** mit aqua dest. verdünnen. Aus 50 mL Konzentrat lässt sich folglich 1 L verdünnte Waschlösung herstellen. Nach dem Öffnen ist das Konzentrat in der Originalflasche **8 Wochen bei 2-8°C** haltbar. Nach Verdünnung kann die Waschlösung unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung **7 Tage bei 2-8°C** gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
9. **TMB:** Gebrauchsfertig. Nach dem Öffnen kann das Substrat unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung in der Originalflasche **8 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.
10. **SA (Stopplösung):** Gebrauchsfertig. Enthält Schwefelsäure, der aufgeführte Warnhinweis ist zu beachten. Nach dem Öffnen kann die Stopplösung unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung in der Originalflasche **8 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden.

LAGERUNG:

Ungeöffnete Reagenzien müssen bei 2-8°C in der Originalverpackung gelagert werden und sind dann bis zu dem auf dem Etikett aufgedruckten Verfalldatum stabil.

ERFORDERLICHE MATERIALIEN, DIE NICHT IM KIT ENTHALTEN SIND:

- 8-Kanal- oder Repetierpipette mit einem Pipettiervolumen im Bereich von 50-300 µL
- Einkanalpipetten mit Pipettiervolumina in den Bereichen von jeweils 0-20, 20-200 und 200-1000 µL
- Mikrotiterplattenwascher und -schüttler
- Mikrotiterplattenleser zur Messung bei einer Wellenlänge von 450 nm
- Aqua dest.

PROBENGEWINNUNG UND VORBEREITUNG:

Die Gewinnung und Lagerung der Proben hat gemäß aktueller lokaler Vorschriften zu erfolgen (Vorschriften für die Probengewinnung, -handhabung und –lagerung in den USA sind im CLSI-Dokument GP44-A4 veröffentlicht).

- Proben: Das humane Plasma wird in Tri-Natrium Citrat als Antikoagulanz abgenommen. Auch Na^+-EDTA-Plasma kann verwendet werden, die Lagerbedingungen sind identisch mit denen von Citratplasma. Ebenfalls können Heparin-abhängige Antikörper in humanem Serum getestet werden. Das Serum wird dann auf für Labortests übliche Art vorbereitet. Lagerung und Haltbarkeit entsprechen denen des Citratplasmas.
- Blutabnahme: Blut (9 Volumenteile) wird vorsichtig in 0,109 M Citrat als Antikoagulanz (1 Volumenteil) abgenommen. Die Blutabnahme erfolgt durch Venenpunktion. Das erste Röhrchen ist zu verwerfen.
- Zentrifugation: Die Herstellung von plättchenarmem Plasma hat innerhalb von 2 Stunden nach Blutabnahme gemäß einem validierten, laborspezifischen Verfahren zu erfolgen, z.B. durch Zentrifugation bei Raumtemperatur (18-25°C) für 15 Minuten bei 2500g. Das Plasma wird anschließend in ein Kunststoffröhrchen überführt.
- Lagerung der Plasmaproben bis zu:
  - 24 Stunden bei Raumtemperatur (18-25°C).
  - 6 Monate tiefgefroren bei -20°C

Gefrorene Plasmaproben sollten bei 37°C aufgetaut, gut durchmischt und dann innerhalb von 72 Stunden getestet werden. Jegliche Ablagerungen sind durch gründliches Mischen sofort nach dem Auftauen und vor dem Testen zu resuspendieren.

TESTDURCHFÜHRUNG:

1. Die Kontrollen (C+ und C-) liegen nach Rekonstitution bereits **1:100 vorverdünnt** vor und müssen zur Testung nicht weiter verdünnt werden.

2. Die Proben müssen zur Testung **1:100** mit HIA Probenverdünner (SD) verdünnt werden. Bei sehr hohen Titern Heparin-abhängiger Antikörper müssen die Proben in höherer Verdünnung (**1:200 oder 1:400)** getestet und die Ergebnisse mit 2 bzw. 4 multipliziert werden.

3. Die für die Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen aus dem Aluminiumbeutel entnehmen und in den mitgelieferten Rahmen legen. Dann nach folgendem Schema verfahren:

Reagenz	Volumen	Vorgehen
Plättchenlysat (CLy), mit 2,0 mL aqua dest. rekonstituiert	**50 µL**	In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren
Leerwert (nur Probenverdünner), Kontrollen (unverdünnt) oder Proben (1:100 verdünnt)	**200 µL**	In die einzelnen Vertiefungen **sofort** hinzupipettieren **(a)**
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (b)		
Waschlösung (WS), 1:20 mit aqua dest. verdünnt	**300 µL**	**5 aufeinanderfolgende Waschschritte** unter Verwendung eines Waschgeräts **(c)**
Anti-(h)-IgG Fcγ-HRP-Immunkonjugat, mit 7,5 mL Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert	**200 µL**	Unmittelbar nach dem letzten Waschschritt in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren **(c)**
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (b)		
Waschlösung (WS), 1:20 mit aqua dest. verdünnt	**300 µL**	**5 aufeinanderfolgende Waschschritte** unter Verwendung eines Waschgeräts **(c)**
Peroxidasesubstrat (TMB)	**200 µL**	Unmittelbar nach dem letzten Waschschritt in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren. Die Zugabe des Substrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen. **(c), (d)**
Für 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (b)		
Stopplösung (SA)	**50 µL**	In identischen Zeitabständen wie bei der Zugabe des Substrats in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren, um die Farbreaktion zu stoppen **(c), (d)**
Zur Stabilisierung der Farbe **für 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren**, die Absorption bei **450 nm (A_{450})** messen und jeweils den Leerwert subtrahieren **(e)**		

Anmerkungen:

(a) Um eine homogene Antigenbindung zu gewährleisten müssen die Kontrollen und Proben so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 10 Minuten in die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen pipettiert werden. Etwaige Verzögerungen können zu falschen Ergebnissen führen.

(b) Während der Inkubationen und hierbei besonders während der Farbentwicklung sollten die Testansätze vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden. Es kann ein Mikrotiterplattenschüttler verwendet werden. Jede Inkubation muss bei Raumtemperatur (18-25°C) erfolgen. Eine Inkubation bei < 18°C kann zu einer starken Erniedrigung, eine Inkubation bei > 25°C zu einer starken Erhöhung der Reaktivität führen. Dies ist bei der Analyse der Ergebnisse zu berücksichtigen. Bei Verwendung eines Mikrotiterplattenschüttlers sollte dieser lediglich zu Beginn eines jeden Schritts (hinzupipettieren der Proben, des Immunkonjugats, der Stopplösung) für 1-2 Minuten zum Einsatz kommen, um eine gute Homogenität zu erreichen. Ein Schütteln während der gesamten Inkubation ist zu vermeiden, da dies zu einer starken Erhöhung der Reaktivität führen kann.

(c) Im Zuge der Entfernung der Waschlösung nach jedem einzelnen Waschschritt dürfen die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen niemals austrocknen, da dies die an der Platte immobilisierten Komponenten beeinträchtigen könnte. Deshalb muss das darauffolgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb von 3 Minuten nach Entfernung der Waschlösung in die einzelnen Vertiefungen pipettiert werden. Falls nötig, kann die Platte mit Waschlösung gefüllt bleiben und erst direkt vor Zugabe des nächsten Reagenzes geleert werden Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird.

(d) Die Zugabe des Peroxidasesubstrats von Reihe zu Reihe muss in genau definierten Zeitabständen erfolgen. Diese Zeitabstände müssen bei der anschließenden Zugabe der Stopplösung eingehalten werden.

(e) Bei bichromatischen Messungen kann eine Referenzwellenlänge von z.B. 620 oder 690 nm verwendet werden.

VALIDIERUNG:

Die im Testkit enthaltenen Kontrollen (C+ und C-) ermöglichen die Überprüfung einer korrekten Testdurchführung. Die für die Kontrollen erwarteten, bei 450 nm ermittelten Absorptionen (A_{450}) variieren von Charge zu Charge, liegen aber, sofern der Test bei Raumtemperatur (18-25°C) durchgeführt wird, immer wie folgt:

Positivkontrolle (C+): $A_{450} \geq 1{,}0$ | **Negativkontrolle (C-): $A_{450} \leq 0{,}25$**

Die für die Kontrollen einer bestimmten Charge erwarteten A450-Werte werden auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, angeführt und gelten bei einer Testdurchführung bei 20 ± 1°C. Wird der Test bei einer davon abweichenden Temperatur durchgeführt, so können sich die gemessenen A450-Werte von den erwarteten A450-Werten unterscheiden.

ERGEBNISSE:

Die **Proben** werden entsprechend der jeweils gemessenen A_{450}-Werte als positiv oder negativ eingestuft. Wurden die Proben **anders als 1:100** verdünnt, muss der gemessene A_{450}-Wert unter Berücksichtigung des abweichenden Verdünnungsfaktors D **mit D:100 multipliziert** werden (z.B. mit 200:100 = **2 bei einer Verdünnung von 1:200**).

INTERPRETATION DER ERGEBNISSE:

Bei einer Testdurchführung bei Raumtemperatur (18-25°C) gelten folgende Bewertungsbereiche:

Positiv:	**$A_{450} > 0{,}50$**
Schwach positiv:	**$0{,}30 < A_{450} \leq 0{,}50$**
Negativ:	**$A_{450} \leq 0{,}30$**

Die Temperatur kann einen starken Einfluss auf die Reaktivität der Testansätze haben. Wird der Test nicht bei Raumtemperatur (18-25°C) durchgeführt, ist eine Anpassung des Cutoffs zwischen dem negativen und dem schwach positiven Bewertungsbereich empfohlen. Zu diesem Zweck wird der auf dem Datenblatt, das jeder Testpackung beigelegt ist, angeführte Prozentsatz herangezogen. Dieser Prozentsatz ist chargenabhängig und entspricht dem A450-Wert des Cutoffs im Vergleich zum A450-Wert, der für die Positivkontrolle gemessen wird.

EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Um eine optimale Testleistung zu gewährleisten und die Spezifikationen zu erfüllen, sind die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam zu beachten. Für die Validierung jeglicher Änderungen dieser Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Reagenzien mit ungewöhnlichem Aussehen oder einem Zeichen von Kontamination sind zu verwerfen. Plasmen mit einem Gerinnsel, einer Kontamination oder mit ungewöhnlichem Aussehen sind zu verwerfen.
- Werden die Waschschritte nicht korrekt ausgeführt, kann ein hohes Hintergrundsignal sowie ein großer Absorptionswert bei der Negativkontrolle die Folge sein. Um unerwünschte Farbentwicklungen zu vermeiden, sind die Waschschritte korrekt auszuführen.
- Proben von Patienten mit Entzündungen, Infektionskrankheiten, zirkulierenden Immunkomplexen, Gammopathien oder Autoimmunerkrankungen können, wie in allen Autoantikörper-Testen, auch im ZYMUTEST™ HIA IgG eine niedrige unspezifische Reaktivität im Graubereich oder schwach positiven Bereich aufweisen. In solchen Fällen sollte eine neue Probe auf das Vorliegen von Antikörpern untersucht werden.
- Fehlerhafte Ergebnisse können durch bakterielle Kontamination des Testmaterials, unzureichende Inkubationszeiten, unzureichende Reinigung der Vertiefungen der Mikrotiterplatte, nicht ausreichenden Schutz des Substrats vor Sonnenlicht, Auslassen von Testreagenzien, Abweichen von den vorgeschriebenen Temperaturen oder durch Auslassen von Testschritten hervorgerufen werden.
- Die Ergebnisse dieses Testes sollten nicht als alleinige Grundlage für eine klinische Diagnose herangezogen werden. Obwohl ein positives Ergebnis auf die Anwesenheit Heparin-induzierter Antikörper hinweist, ist dies noch KEINE Bestätigung für das Vorliegen einer HIT bzw. Pseudo-HIT.
- Bei manchen Patienten können natürlich auftretende Antikörper gegen PF4 oder gegen Chemokine vorliegen.

PATHOLOGISCHE VARIANTEN:

Heparin-abhängige Antikörper sind Immunglobuline, die im Plasma von Patienten mit Verdacht auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) vom Typ II vorliegen.

Eine HIT vom immunallergischen Typ (Typ II) kann während einer Heparinbehandlung auftreten[1,2] und ist eine der wesentlichen Komplikationen dieser Therapie. Sie beruht auf der Bildung von Antikörpern, die gegen Protein (gewöhnlich PF4):Heparin-Komplexe gerichtet sind.[3,4] Neben Antikörpern gegen Heparin im Komplex mit PF4 wurden, wenn auch seltener, Antikörper gegen Heparin im Komplex mit anderen Chemokinen wie IL-8 und NAP2 beschrieben.[5] Im Wesentlichen ist eine symptomatische HIT Typ II auf Heparin-abhängige Antikörper vom IgG-Isotyp zurückzuführen. Um das Risiko für klinische Komplikationen im Rahmen einer HIT Typ II zu bestimmen, kann jedoch ein Screening nach allen drei Isotypen als prognostische Marker hilfreich sein. Dafür ist der ZYMUTEST™ HIA IgGAM (Art.Nr. RK040D) vorgesehen.

Wenn eine HIT erstmals auftritt, entwickeln sich, mit verschiedenen medizinischen oder chirurgischen Kontexten einhergehend, Entzündungen und/oder Plättchenaktivierungsmechanismen, die zu einer erhöhten Freisetzung von Chemokinen führen und anschließend die Bildung von Heparin-Komplexen mit Chemokinen (gewöhnlich PF4) fördern. Diese multimolekularen Komplexe können antigenisch werden und die Bildung von Heparin-abhängigen Antikörpern hervorrufen. Die Vielfalt an Heparin-abhängigen Antikörpern, die für die Entstehung einer HIT Typ II verantwortlich sein können, erklärt eventuelle Diskrepanzen zwischen einem klinischen Bild und den Ergebnissen diagnostischer Teste[6] nur teilweise.

Oftmals sind Heparin-abhängige Antikörper, besonders solche vom IgM-Isotyp, asymptomatisch. Die klinische Assoziation ist bei erhöhten Antikörper-Konzentrationen und dem IgG-Isotyp stärker.

ANWENDUNGEN:

- Klinischer Verdacht auf HIT während einer Heparin-Behandlung (Hautnekrose, Sinken der Thrombozytenzahl auf <100*10⁹/L oder Abnahme um mehr als 30% zwischen aufeinanderfolgenden Untersuchungen). Weitere mögliche Gründe für Thrombozytopenie sollten geklärt werden. Bei Vorliegen einer Thrombozytopenie kann ein positiver Test die Diagnose bestätigen.
- Heparin-abhängigen Antikörpern vom IgG-Isotyp wird die stärkste Korrelation bei der Entwicklung einer HIT zugeschrieben. Der ZYMUTEST™ HIA IgG Testkit (Art.Nr. RK040A) bietet somit einerseits eine verbesserte Spezifität für die klinische Komplikation HIT, andererseits aber eine geringere Sensitivität, da Fälle, die ausschließlich mit Antikörpern vom IgM- bzw. IgA-Isotyp assoziiert sind, nicht nachgewiesen werden.

CHARAKTERISIERUNG POSITIVER PROBEN (SOFERN NOTWENDIG):

Falls erforderlich können positive Proben durch einen Heparin-Inhibitionstest weiter charakterisiert werden. Zu diesem Zweck werden 500 µL der 1:100 mit HIA Probenverdünner (SD) verdünnten Probe mit 10 µL 100 IE/mL unfraktioniertem Heparin vermischt und der Test wie in obiger Tabelle beschrieben wiederholt. Die hohe Endkonzentration von 2 IE/mL Heparin in der Probe hemmt die Bindung Heparin-abhängiger Antikörper an die Mikrotiterplatte. Ein positiver Heparin-Inhibitionstest (A_{450}-Wert < 50% des im ursprünglichen Testansatz gemessenen A_{450}-Wertes) bestätigt in den meisten Fällen die Anwesenheit Heparin-abhängiger Antikörper.

Bei sehr seltenen Proben, die bereits ohne Zugabe des Plättchenlysats positiv sind, ist diese Inhibition nicht zu beobachten und das Testergebnis bleibt mit oder ohne Zugabe von Heparin positiv. Das (nach heutigem Kenntnisstand unklare) Ergebnis ist in diesem Fall als nicht eindeutig einzustufen und muss gemeinsam mit anderen Testen oder Kriterien für die Diagnose einer HIT interpretiert werden.

Ein negativer Heparin-Inhibitionstest (A_{450}-Wert > 50% des im ursprünglichen Testansatz gemessenen A_{450}-Wertes) schließt in den meisten Fällen die Anwesenheit Heparin-abhängiger Antikörper aus.

LEISTUNGSMERKMALE:

- Keine Beeinflussung durch Heparine bis zu 1 IE/mL und direkte IIa- und Xa-Inhibitoren bis 800 ng/mL.
- Externe Studie: ZYMUTEST™ HIA IgG vs. Serotonin Release Assay (SRA) mit n = 174 Proben. Übereinstimmung bedeutet, dass beide Teste entweder positiv oder negativ waren:

Übereinstimmungen		131
% Übereinstimmung		75,29

- Externe Studie an zwei Standorten: ZYMUTEST™ HIA IgG vs. Asserachrom® HPIA mit n = 243 Proben:

		Asserachrom® HPIA	
		Positiv	Negativ
ZYMUTEST™ HIA IgG	Positiv	33	17
	Negativ	42	151
Übereinstimmung		76%	
Übereinstimmung, positiv		44%	
Übereinstimmung, negativ		90%	
Probenanzahl		243	

- Beispieldaten zur Reproduzierbarkeit:

	Intra-Assay			Inter-Assay		
Probe	**n**	**A_{450}**	**VK (%)**	**n**	**A_{450}**	**VK (%)**
HIA IgG Positivkontrolle	6	1,31	3,07	7	1,34	7,11

REFERENZEN:

1. Gruel Y. *et al.* Thrombopénie induite par les héparines: manifestations cliniques et physiopathologie. Presse Med.1998.
2. Warkentin TE *et al.* Heparin-induced thrombocytopenia in patients treated with low molecular weight heparin or unfractionated heparin. N Eng J Med 1995.
3. Amiral J *et al.* Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. Thromb Haemost 1992.
4. Amiral J *et al.* Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. Thromb Haemost 1995.
5. Amiral J *et al.* Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. Blood. 1996.
6. Elalamy *et al.* Diagnostic et gestion des thrombopénies induites par l'héparine. Rev Mal Respir. 1999.
7. Warkentin TE *et al.* Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Transfus Med Rev, 2006.
8. Greinacher A *et al.* Heparin induced thrombocytopenia: frequency and pathogenesis. Pathophysiol Haemost Thromb, 2006.
9. CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".

SYMBOLE:

Verwendete Symbole und Zeichen sind in der ISO-Norm 15223-1 gelistet. Das der Packung beiliegende Zeichenerklärungs-Blatt ist zu beachten.

Änderungen im Vergleich zur Vorversion

HYPHEN BioMed
155 rue d'Eragny, 95000 Neuville-sur-Oise, France