



# ZYMUTEST HIA IgGAM

Art.Nr. RK040D

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



**Vertrieb und Support:**  
**CoaChrom Diagnostica GmbH**  
 www.coachchrom.com | info@coachchrom.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

### VERWENDUNGSZWECK:

Der ZYMUTEST HIA IgGAM ist ein optimierter ELISA zur globalen Bestimmung und zum qualitativen Screening Heparin-abhängiger Antikörper der IgG-, IgM- und IgA-Isotypen in humanem Plasma, Serum oder anderen biologischen Flüssigkeiten.

### ZUSAMMENFASSUNG:

Der ZYMUTEST IgGAM ist ein Test zur globalen Bestimmung von Heparin-abhängigen Antikörpern der IgG-, IgM- und IgA-Isotypen. Er verwendet eine stabilisierte Beschichtung aus biologisch verfügbarem, unfraktioniertem Heparin. Somit erlaubt er volle Reaktivität mit Heparin-abhängigen Antikörpern und Proteinen. Dieses optimierte Testsystem ermöglicht hohe Reproduzierbarkeit durch Identifizierung aller Heparin-abhängigen Antikörper, indem die *in vivo*-Bindungsmechanismen dieser Antikörper an auf der Zelloberfläche, insbesondere auf Thrombozyten oder Endothelzellen, befindlichem Heparin nachgeahmt werden.

### TESTPRINZIP:

Die verdünnte Probe (humanes Plasma, Serum oder andere biologische Flüssigkeiten) wird zusammen mit einem Plättchenlysat in die Vertiefungen der beschichteten Mikrotiterplatte pipettiert. Sind Heparin-abhängige Antikörper des IgG, IgM- oder IgA-Isotypen vorhanden, so komplexieren sie mit dem biologischen verfügbaren, unfraktionierten Heparin, das in der Mikrotiterplatte im Überschuss vorhanden ist. Nach einem ersten Waschschritt erfolgt die Zugabe des Immunkonjugats, das aus drei Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten polyklonalen Ziegen-Antikörpern besteht (Anti-Human IgG (Fcγ)-spezifisch, Anti-Human IgM (μ)-spezifisch, Anti-Human IgA (α)-spezifisch). Dieses Immunkonjugat reagiert spezifisch und homogen mit den IgG-, IgM- und IgA-Isotypen. Nach einem zweiten Waschschritt wird das Peroxidassubstrat, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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 des IgG-, IgA- und IgM-Isotypen in der Probe.

### IM KIT ENTHALTENE KOMponentEN:

- COAT:** ELISA-Mikrotiterplatte, bestehend aus 12 Mikrotiterstreifen zu je 8 Vertiefungen, mit einer stabilisierten Beschichtung aus biologisch verfügbarem, unfraktioniertem Heparin. Jeder Streifen ist einzeln in einem versiegelten Aluminiumbeutel mit Trockenmittel verpackt.
- SD:** 2 Flaschen mit je 50 mL **HIA Probenverdünner**, gebrauchsfertig. Enthält Natriumazid.
- C+:** 3 Flaschen **HIA IgG Positivkontrolle**, lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit **1 mL HIA Probenverdünner (SD)** erhält man eine gebrauchsfertige 1:100 vorverdünnte Positivkontrolle. Die erwartete Reaktivität ist auf dem der Packung beiliegenden Datenblatt angegeben.
- C-:** 3 Flaschen **Negativkontrolle** (verdünntes humanes Normalplasma), lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit **1 mL HIA Probenverdünner (SD)** erhält man eine gebrauchsfertige 1:100 vorverdünnte Negativkontrolle. Enthält BSA.
- CLy:** 3 Flaschen **Plättchenlysat**, lyophilisiert, enthält verdünntes humanes Normalplasma. Mit **2 mL aqua dest.** zu rekonstituieren. Enthält BSA.
- IC:** 3 Flaschen **Immunkonjugat:** Anti-IgG (Fcγ)-IgM (μ)-IgA (α)-HRP-Immunkonjugat, HRP-gekoppelte Ziegen-Antikörper spezifisch für humanes IgG (Fcγ, IgM (μ), IgA (α)), lyophilisiert. Durch Rekonstitution mit **7,5 mL Konjugatverdünner (CD)** erhält man das gebrauchsfertige Immunkonjugat. Enthält BSA.
- CD:** 1 Flasche mit 25 mL **Konjugatverdünner**, gebrauchsfertig.
- WS:** 1 Flasche mit 50 mL 20-fach konzentrierter **Waschlösung**.
- TMB:** 1 Flasche mit 25 mL **Peroxidassubstrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)**, versetzt mit Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), gebrauchsfertig.
- 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. Kupferamaturen unter Bildung hochexplorier 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 Verdunstungs-oberfläche 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 jeglichen Haut- und Augenkontakt zu vermeiden.
- Zur *in-vitro*-Diagnostik.

SA: H290: Kann korrodierend auf Metalle wirken.  
 H315: Ruft Hautirritationen hervor.  
 CLy: H319: Ruft schwere Augenirritationen hervor.  
 H317: Kann allergische Hautreaktionen hervorrufen.  
 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 der Testkit innerhalb von zwei Monaten und wenn nötig streifenweise verwendet werden.

- COAT (ELISA-Mikrotiterplatte):** Den Aluminiumbeutel öffnen und die für die jeweilige Testreihe erforderliche Anzahl an Mikrotiterstreifen entnehmen. Diese müssen innerhalb von 30 Minuten verwendet werden. Zur Lagerung werden nicht benötigte Streifen in Gegenwart des Trockenmittels im originalen Aluminiumbeutel verschlossen und im mitgelieferten Druckverschlussbeutel verpackt. Unter diesen Bedingungen sind die Streifen **8 Wochen bei 2-8°C** haltbar.

- SD (HIA Probenverdünner):** Gebrauchsfertig. Das Reagenz 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.
- C+ (HIA Positivkontrolle):** Den Inhalt der Flasche mit **1 mL HIA Probenverdünner (SD)** rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Somit erhält man eine **1:100 vorverdünnte**, gebrauchsfertige Positivkontrolle, die einem Plasma entspricht, das Heparin-abhängige Antikörper vom IgG-, IgM- und IgA-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.
- C- (Negativkontrolle):** Den Inhalt der Flasche mit **1 mL HIA Probenverdünner (SD)** rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Somit erhält man eine **1:100 vorverdünnte**, gebrauchsfertige 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.
- CLy (Plättchenlysat):** Den Inhalt der Flasche mit **2 mL aqua dest.** rekonstituieren und bis zur vollständigen Auflösung des Inhalts gut durchmischen. Unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung ist das nach Rekonstitution gebrauchsfertige Plättchenlysat in der Originalflasche **2 Wochen bei 2-8°C** und **2 Monate bei ≤ -20°C** stabil.
- IC (Anti-IgG(Fcγ)-IgM(μ)-IgA(α)-HRP-Immunkonjugat):** Den Inhalt der Flasche mindestens 15 Minuten vor Verwendung mit **7,5 mL Konjugatverdünner (CD)** rekonstituieren. Vor Gebrauch muss der Inhalt vollständig gelöst sein. Zur gleichmäßigen Durchmischung der Lösung ist die Flasche leicht zu schwenken. 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.
- 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.
- WS (Waschlösung):** Wenn nötig im Wasserbad bei **37°C** bis zur vollständigen Auflösung von Feststoffen inkubieren. Schütteln 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 kann das Konzentrat in der Originalflasche **8 Wochen bei 2-8°C** gelagert werden. Nach Verdünnung kann die Waschlösung unter Vermeidung jeglicher Kontamination und Verdunstung **7 Tage bei 2-8°C** gelagert werden. Enthält 0,05% Kathon CG.
- 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.
- SA (Stopplösung):** Gebrauchsfertig. Enthält 0,45 M 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:

Ungedörrte 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:

- Aqua dest.
- 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

### 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 Antikoagulant 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 Antikoagulant (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:

- Die Kontrollen (C+ und C-) liegen nach Rekonstitution bereits gebrauchsfertig **1:100 vorverdünnt** vor.
- Die Proben müssen zur Testung **1:100 mit HIA Probenverdünner (SD)** verdünnt werden. Werden sehr hohe Titer Heparin-abhängiger Antikörper erwartet, müssen die Proben in höherer Verdünnung (**1:200 oder 1:400**) getestet werden.
- 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
<b>Plättchenlysat (CLy)</b> , mit 0,5 mL aqua dest. rekonstituiert	50 µL	In jeweils eine Vertiefung der Mikrotiterstreifen pipettieren
<b>Positivkontrolle</b> oder <b>Negativkontrolle</b> oder <b>1:100 verdünnte Probe</b> oder <b>Probendiluent (Leerwert)</b>	200 µL	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Positivkontrolle</b> oder</li> <li>- <b>Negativkontrolle</b> oder</li> <li>- <b>Verdünte Probe</b> oder</li> <li>- <b>Probendiluent</b></li> </ul> in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sofort pipettieren (a)

Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (b)		
Waschlösung (WS), 1:20 mit aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschrötte unter Verwendung eines Waschrötes (c)
Anti-IgG(Fcy)-IgM(µ)-IgA(α)-HRP-Immunkonjugat, mit 7,5 mL Konjugatverdünner (CD) rekonstituiert	200 µL	Unmittelbar nach dem letzten Waschrötte in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren (c)
Für 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren (b), Fortsetzung auf der RÖckseite		
Waschlösung (WS), 1:20 mit aqua dest. verdünnt	300 µL	5 aufeinanderfolgende Waschrötte unter Verwendung eines Waschrötes (c)
Peroxidasesubstrat (TMB)	200 µL	Unmittelbar nach dem letzten Waschrötte in die einzelnen Vertiefungen hinzupipettieren. <b>Anmerkung:</b> Die Zugabe des Substrates muss Reihe für Reihe genau durchgeföhrt werden. (c,d)
Farbentwicklung für exakt 5 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) ablaufen lassen (b)		
Stopplösung (SA)	50 µL	In exakt den gleichen Zeitintervallen wie bei der Zugabe des Substrates die Farbentwicklung durch Zugabe von 0.45M Schwefelsäure stoppen. (c,d)
Nach 10 Minuten Wartezeit zur Stabilisierung die Absorption bei 450 nm (A <sub>450</sub> ) messen und den Leerwert subtrahieren. (e)		

#### Anmerkungen:

- 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. 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. Dies ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen. Ein Mikrotiterplatten-Schüttler sollte nur am Beginn eines Inkubationsschrittes (Pipettieren der Proben, Zugabe Immunkonjugat, 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 Waschrötte niemals vollständig austrocknen. Um das Austrocknen der Mikrotitervertiefungen und damit eine Beschädigung der immobilisierten Komponenten zu verhindern, muss das folgende Reagenz so rasch wie möglich und jedenfalls innerhalb der nächsten 3 Minuten zugegeben werden. Falls erforderlich, können die Mikrotitervertiefungen mit Waschlösung gefüllt bleiben und erst kurz vor der Zugabe des folgenden Reagenz geleert werden. Der Mikrotiterplattenwascher muss so eingestellt sein, dass die Platten schonend gewaschen werden und ein abruptes Entfernen der Waschlösung vermieden wird.
- 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.
- 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<sub>450</sub>) variieren von Charge zu Charge, liegen aber, sofern der Test bei Raumtemperatur (18-25°C) durchgeföhrt wird, immer wie folgt:

Positivkontrolle (C+): A<sub>450</sub> ≥ 1,0

Negativkontrolle (C-): A<sub>450</sub> ≤ 0,30

Die für die Kontrollen einer bestimmten Charge erwarteten A<sub>450</sub>-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 durchgeföhrt, so können sich die gemessenen A<sub>450</sub>-Werte von den erwarteten A<sub>450</sub>-Werten unterscheiden.

#### 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

Wenn die Raumtemperatur bei der Testdurchführung außerhalb des empfohlenen Bereiches liegt, können die Absorptionsergebnisse beeinflusst werden. In diesem Fall kann die Positivkontrolle zur Anpassung der Grenzwerte verwendet werden. Das der Packung beigelegte Datenblatt gibt den chargenspezifischen A<sub>450</sub>-Wert der Positivkontrolle an sowie den A<sub>450</sub>-Wert in % der Positivkontrolle, der dem Cut-Off entspricht. Der umgerechnete Wert für den Cut-Off ist der entsprechende %-Wert der Absorption der Positivkontrolle in der jeweiligen Analysenserie.

#### EINSCHRÄNKUNGEN DES TESTES:

- Eine optimale Testleistung ist nur gewährleistet, wenn die technischen Anweisungen von HYPHEN BioMed sorgsam beachtet werden. Für die Validierung jeglicher Änderungen dieser Anweisungen ist das Labor verantwortlich.
- Reagenzien mit ungewöhnlichem Aussehen oder einem Zeichen für Kontamination sind zu verwerfen. Plasmen mit einem Zeichen für Kontamination sind zu verwerfen.
- Werden die Waschrötte nicht korrekt ausgeführt, kann ein hohes Hintergrundsignal sowie ein großer Absorptionwert bei der Negativkontrolle die Folge sein. Um unerwünschte Farbentwicklungen zu vermeiden, sind die Waschrötte korrekt auszuführen.
- Proben von Patienten, die an Entzündungen, Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen leiden, können, wie in allen Autoantikörper-Testen, auch im ZYMUTEST HIA IgGAM hohe Hintergrundsignale aufweisen und dadurch als schwach positiv interpretiert werden. In solchen Fällen empfiehlt sich die Wiederholung des Testes anhand einer Probe aus einer späteren Abnahme.
- Fehlerhafte Ergebnisse können durch bakterielle Kontamination der Testmaterialien, unzureichende Inkubationszeiten, ungenügendes Waschen bzw. Entleeren der Mikrotitervertiefungen, Streulichexposition 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 Diagnose herangezogen werden.
- Obwohl ein positives Ergebnis auf die Anwesenheit Heparin-abhängiger Antikörper hinweist, ist dies noch KEINE BESTÄTIGUNG für das Vorliegen einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT).
- Bei manchen Patienten können natürlich auftretende Antikörper gegen PF4 oder gegen Chemokine vorliegen.

#### PATHOLOGISCHE VARIATIONEN:

Heparin-abhängige Antikörper sind Immunglobuline, die im Plasma von Patienten mit Verdacht auf Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT), Typ I 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 das Neutrophil-aktivierende Peptid 2 (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 IgG-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.

#### ANWENDUNGEN:

- Klinischer Verdacht auf HIT während einer Heparin-Behandlung (Hautnekrose, Sinken der Thrombozytenzahl auf <100,10<sup>9</sup> G/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 Antikörper 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- und/oder IgA-Isotyp assoziiert sind, nicht nachgewiesen werden.

#### ERGÄNZENDE TESTE:

Die verschiedenen Isotypen können spezifisch mit dem ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM (Art.Nr. RK040E) nachgewiesen werden. Dieser Test erlaubt somit eine komplette Isotypisierung Heparin-abhängiger Antikörper und ist für jede Forschungsstudie oder künftige Entwicklung einer HIT während einer Heparinbehandlung von besonderem Interesse.

#### 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 (Plasma oder Serum) 10µl einer 100 IE/mL-Lösung von unfraktioniertem Heparin zugegeben und homogener vermischt. Diese heparinisierte Probe (Endkonzentration 2 IE/mL) 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 Plättchenlysat 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.

#### LEISTUNGSMERKMALE:

- Keine Beeinflussung durch Heparin bis zu 1 IE/mL.
- 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 *et al.* Thrombopénie induite par les héparines manifestations cliniques et physiopathologie. Presse Med. 1998.
- Warkentin *et al.* Heparin induced thrombocytopenia in patient treated with low molecular weight heparin or unfractionated heparin. N eng J Med 1995.
- Amiral J *et al.* Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparine induced thrombocytopenia: Thromb haemost. 1992.
- Amiral J *et al.* Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. Thromb Haemost 1995.
- Amiral J *et al.* Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin associated thrombocytopenia. Blood, 1996.
- Elalamy *et al.* Diagnostic et gestion des thrombopénies induites par l'héparine. Rev Mal Respir. 1999.
- Warkentin TE *et al.* Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Transfus Med Rev. 2006.
- Greinacher A *et al.* Heparin induced thrombocytopenia: frequency and pathogenesis. Pathophysiol Haemost Thromb. 2006.
- 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 beigelegte Zeichenerklärungs-Blatt ist zu beachten.