

ZYMUTEST HIA MonoStrip IgG

RK041A

**Kvalitativní test pro detekci heparin-dependentních protilátek IgG
metodou ELISA**

Pouze pro účely „In Vitro“

Poslední revize: 29/09/2009

POUŽITÍ:

ZYMUTEST HIA MonoStrip IgG ELISA souprava je kvalitativní test určený pro stanovení heparin-dependentních protilátek třídy IgG v lidské plazmě v klinických laboratořích. Je určen pro „In Vitro“ použití. Každá souprava umožňuje provést 4 serie po 8 testech (t.j. C+, C-, vzorek a blank v dubletu) a nabízí tak možnost jednotlivých stanovení.

PRINCIP:

Ředěná testovaná plazma se pipetuje do jamky destičky, ve které je v předchozím kroku přidán buněčný lysát. Pokud jsou přítomny heparin-dependentní protilátky třídy IgG, vytvoří komplexy s biologicky dostupným nefrakcionovaným heparinem, vázaným na destičce. Následuje promývací krok. Navázané protilátky jsou potom detekovány pomocí imunokonjugátu, který je tvořen kozí polyklonální protilátkou proti lidskému IgG (Fc_γ specifické) a peroxidázou (HRP). Tento imunokonjugát reaguje specificky s IgG typem protilátky. Následuje další promytí. potom se přidá peroxidázový substrát – Tetramethylbenzidin (TMB), který v přítomnosti peroxidu vodíku (H₂O₂) vytvoří modré zbarvení. Po zastavení kyselinou sírovou se barva změní na žlutou. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství heparin-dependentních protilátek třídy IgG přítomných v testovaném vzorku.

VZOREK:

- Lidská citrátová plazma

REAGENCE:

- COAT: Micro ELISA proužky**, 4 proužky po 8 jamkách, potažených nefrakcionovaným heparinem biologicky dostupným, saturovaným a potom stabilizovaným. Každý proužek je individuálně zabalen v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem.
- SD:** 2 lahvičky s obsahem 12 ml **HIA diluentu vzorku** připraveného k použití. Obsahuje Azid sodný.
- C+:** 4 lahvičky **HIA pozitivní kontroly** lyofilizované. Každá lahvička se rozpustí s **0,5 ml HIA diluentu vzorku** a získá se tak pozitivní kontrola připravená k použití (již ředěná 1:100). Očekávaná reaktivita je uvedena na letáku přiloženém k soupravě.
- C-:** 4 lahvičky **negativní kontroly**, lyofilizované (ředěná normální lidská plazma). Po rozpuštění s **0,5 ml HIA diluentu vzorku** se získá negativní kontrola připravená k použití (již ředěná 1:100).
- CLy:** 4 lahvičky **buněčného lysátu**, lyofilizovaného (ředěná normální lidská plazma). Po rozpuštění s **0,5 ml destilované vody** se získá reagentie připravená k použití.
- IC:** 4 lahvičky **imunokonjugátu (Anti-IgG (Fc_γ)-HRP imunokonjugát)**, kozí protilátky specifické pro lidský IgG (Fc_γ) s navázanou HRP, lyofilizované. Po rozpuštění s **2 ml diluentu konjugátu (CD)** se získá imunokonjugát připravený k použití.
- CD:** 1 lahvička 10 ml **diluentu konjugátu**, připraveného k použití.
- WS:** 2 lahvičky 12 ml **promývacího roztoku**, 20x koncentrovaného.
- TMB:** 1 lahvička 10 ml peroxidázového substrátu: **3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine**, s obsahem peroxidu vodíku. Připraven k použití.
- SA:** 1 lahvička 3 ml **0,45 M kyseliny sírové** (zastavovací roztok). Připraven k použití. ❌

Poznámka: Užívejte komponenty pouze z kitu stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kitů o různých šaržích v jednom testu.

REAGENCE A VYBAVENÍ POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

- 8-kanálová pipeta nebo rozplňovací pipeta 50 – 300 µl
- 1-kanálové pipety o různých objemech od 0 - 20 µl, 20 – 200 µl, 200 – 1000 µl
- Promývačka mikrotitračních destiček (a třepačka)
- ELISA Reader s vlnovou délkou 450 nm
- Destilovaná voda

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

V originálním balení, před použitím, pokud jsou skladovány v 2-8°C jsou neotevřené reagentie stabilní do data vytištěného na obalu.

- Mikro ELISA proužky:** otevřete plastové pouzdro a vyjměte proužek pro analýzu. Pokud jsou mimo pouzdro, musí být testovací proužek použit do 30 minut.
- HIA diluent vzorku:** je připraven k použití. Po otevření může být používán po **8 týdnů**, pokud je skladován při **2-8°C** a pokud je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití. Obsahuje Azid sodný

Upozornění: HIA diluent vzorku obsahuje Azid sodný, který může reagovat s olověným nebo měděným potrubím za vzniku vysoce explozivních azidů kovů. Pokud vyléváte do odpadu, spláchněte velkým objemem vody.

- HIA pozitivní kontrola IgG:** rozpustte každou lahvičku **0,5 ml HIA diluentu vzorku**. Získáte tak pozitivní kontrolu připravenou k použití. Odpovídá plazmě obsahující IgG třídu heparin-dependentní protilátky, již ředěné **1:100**. Po rozpuštění je pozitivní kontrola stabilní **2 týdny při teplotě 2-8°C**, pokud je ochráněna před bakteriální kontaminací, nebo **2 měsíce při teplotě -20°C a nižší**.
- Negativní kontrola:** rozpustte každou lahvičku s **0,5 ml HIA diluentu vzorku**. Tak se získá negativní kontrola již připravena z lidské plazmy testované registrovanými metodami a shledané negativní pro anti-HIV protilátky, HBsAg a anti-HCV protilátky. Přesto, žádný test nemůže zcela vyloučit přítomnost infekčních agens. S každým produktem lidského původu musí být tedy zacházeno s opatrností, jako s potenciálně infekčním materiálem.
- CLy:** rozpustte každou lahvičku s **0,5 ml destilované vody**. Získá se tak reagent připravený k použití. Po rozpuštění je reagent stabilní po **2 týdny při 2-8°C**, pokud je zabráněno bakteriální kontaminaci, nebo **2 měsíce při teplotě -20°C a nižší**.

Upozornění: Cly použité v testu je vyroben z čerstvého koncentrátu lidských trombocytů. Negativní kontrola je též připravena z lidské plazmy testované registrovanými metodami a shledané negativní pro anti-HIV protilátky, HBsAg a anti-HCV protilátky. Přesto, žádný test nemůže zcela vyloučit přítomnost infekčních agens. S každým produktem lidského původu musí být tedy zacházeno s opatrností, jako s potenciálně infekčním materiálem.

- Anti-IgG(Fc_γ)-HRP imunokonjugát:** každá lahvička musí být rozpuštěna se **2 ml diluentu konjugátu**. Nechte částičky kompletně rozpustit. Před použitím opatrně lahvičku promíchejte, aby se obsah homogenizoval. Každý specifický rozpuštěný konjugát je stabilní **24 hodin za pokojové teploty, 4 týdny při 2-8°C** nebo **2 měsíce při teplotě -20°C a nižší**.
- Diluent konjugátu:** Připraven k použití. Po otevření může být užíván po **8 týdnů**, pokud je skladován při **2-8°C** a je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG.
- Promývací roztok:** Inkubujte lahvičku 15 – 30 minut ve vodní lázni v **37°C** dokud se zcela nerozpustí pevné částičky (pokud jsou přítomné). Promíchejte lahvičku a naředte požadovaný objem v poměru 1:20 v destilované vodě (obsah lahvičky 12 ml dovoluje získat 240 ml promývacího roztoku). Promývací roztok musí být skladován při **2-8°C** ve své originální lahvičce a použit do **8 týdnů** po otevření. Ředěný promývací roztok musí být použit do **7 dnů**, pokud bylo zabráněno kontaminaci a pokud byl skladován při **2-8°C**. Obsahuje 0,05% Kathon CG.
- TMB substrát:** Připraven k použití. Po otevření může být používán po **8 týdnů**, pokud je skladován při **2-8°C** a pokud bylo zabráněno bakteriální kontaminaci během používání.
- Zastavovací roztok:** Připraven k použití. ❌

Upozornění: Kyselina sírová, přesto že ředěná na 0,45M, je žíravá. Jako se všemi podobnými látkami, zacházejte s kyselinou sírovou s velkou opatrností. Vyvarujte se kontaktu s kůží a očima. Užívejte ochranné brýle a rukavice.

Pozn.: soupravu přeneste do pokojové teploty nejméně 30 minut před použitím. Skladujte nepoužité reagentie při 2-8°C.

Studie stability provedené při 30°C ukazují, že reagentie mohou být přepravovány při pokojové teplotě bez poškození.

Pokud je kit používán a skladován ve shodě s doporučením, může být používán po dobu dvou měsíců po jednotlivých proužcích, pokud je toto požadováno.

PROVEDENÍ:**Odběr vzorku:**

Krev (9 dílů) musí být odebrána do 0,109M (nebo do 0,129M) citrátu sodného (1 díl), plazma se oddělí centrifugací 20 minut při 2500 g. Citrátová plazma by měla být testována do **24 hodin** nebo skladována zmrazená při teplotě **-20°C** nebo nižší maximálně po dobu 6 měsíců. Plazmu rozmrazujte 15 minut při 37°C těsně před použitím. Rozmražený vzorek musí být testován do **2 hodin**.

Testovaná plazma, vzorek kontroly:

Plazma se testuje v ředění **1:100** v HIA diluentu vzorku (SD). Pokud je očekávána vysoká hladina heparin-dependentních protilátek, musí být vzorek testován v ředění **1:200** nebo **1:400** atd. Výsledek (odpovídající absorbance) pak musí být násoben **2x** nebo **4x** atd.

Kontroly jsou připraveny k použití (již **naředěné 1:100**)

Postup:

Vyjmete proužek z hliníkového pouzdra a vložíte jej do přiloženého rámečku. Do různých jamek ELISA destičky pak pipetujete reagenty dle následujícího postupu:

Reagent	Objem	Testovací krok
Cly	50 µl	Pipetování Cly do jamek mikrotitrační destičky (a)
Pozitivní kontrola IgG - nebo negativní kontrola - nebo 1:100 ředěný vzorek - nebo HIA diluent vzorku (blank)	200 µl	Přidání: - IgG pozitivní kontroly nebo - negativní kontroly nebo - ředěného vzorku nebo - HIA diluentu vzorku do jamek ELISA destičky (a)
Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (18-25°C)		
Promývací roztok (20x ředěný destilovanou vodou)	300 µl	provede 5 promývacích cyklů za použití promývačky (c)
Konjugát (anti-IgG(Fcy)-HRP imunokonjugát, naředěný 2 ml diluentu konjugátu)	200 µl	lhněd po promytí se napipetuje do jamek ELISA destičky specifický imunokonjugát (c)
Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
Promývací roztok (20x ředěný destilovanou vodou)	300 µl	Provede 5 promytí za použití promývačky (c)
TMB/H₂O₂ Substrát	200 µl	lhněd po promytí pipetujte substrát do jamek Pozn.: pipetování substrátu, jamka za jamkou, musí být v přesných časových intervalech (c,d)
Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b)		
0,45 M Kyselina sírová	50 µl	Pipetujte ve stejných časových intervalech jako substrát, přidáním 0,45 M kyseliny sírové zastavíte rozvoj barvy (c,d)
Počkejte 10 minut aby se zbarvení stabilizovalo a měřte absorbanci při 450 nm (A450) (e) . Odečtěte hodnotu blanku.		

a) Pipetujte kontroly a testované vzorky tak rychle, jak je možné (do 10 minut), aby byla obdržena homogenní imunologická kinetická vazba protilátek. Příliš dlouhé prodloužení mezi napipetováním první a poslední jamky může ovlivnit imunologickou kinetiku a vést tak k chybnému výsledku.

b) Vyvarujte se ponechání destičky na slunečním světle během inkubace a zejména během vývoje zbarvení. Může být použita třepačka ELISA destiček. Musí být respektována inkubační teplota 18-25°C. Výsledky jsou ovlivněny při příliš vysoké (>25°C) a příliš nízké (<18°C) teplotě a měření při 450 nm je pak příliš vysoké nebo nízké. To musí být zohledněno při posuzování výsledků. Stejně tak, když je použita třepačka destiček, měla by být použita pouze na začátku každého kroku (napipetování vzorku, imunokonjugátu, zastavovacího roztoku) po dobu 1 až 2 minut, aby se získala dobrá homogenita. Absorbance při 450 nm pak výrazně stoupají, pokud je míchačka použita během celého inkubačního kroku

c) Nikdy nenechávejte jamky prázdné mezi přidáním reagentů nebo po promytí. Následující reagent musí být přidán do 3 minut, aby se zabránilo vyschnutí jamek – poškodilo by navázané komponenty. Pokud je nezbytné, udržujte jamky naplněné promývacím roztokem a vyprázdněte až před pipetováním další reagenty. Promývačka musí být nastavena tak, aby promývala jamky jemně. Je nutné se vyhnout příliš energickému vyprázdnění jamek, aby se nesnížila reaktivita.

d) Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do jamek musí být přesně určeny a stejné intervaly musí pak být při pipetování zastavovacího roztoku

e) Pro bichromatický odečet může být užita referenční vlnová délka 690 nm nebo 620 nm.

KONTROLA KVALITY:

Kontroly v soupravě umožňují validovat správnost provedení testu
Očekávané hodnoty absorbance při 450 nm pro pozitivní kontrolu a negativní kontrolu mohou jevit mírné odlišnosti od šarže k šarži, ale pokud je test proveden při teplotě 18-25°C, pak jsou hodnoty:

P = A450 pro pozitivní kontrolu ≥ 1,0

N = A450 pro negativní kontrolu ≤ 0,25

Získané hodnoty pro P nebo N při 20±1°C jsou uvedeny na letáku, přiloženém k soupravě. Získané absorbance při 450 nm mohou kolísat dle teploty, za které byl test proveden.

VÝSLEDEK:

Výsledek vyjádřen dle A450 jako pozitivní nebo negativní. Pokud je použito větší ředění vzorku, musí být zohledněn dodatečný diluční faktor

INTERPRETACE VÝSLEDKU:

Pokud je test proveden při 20±1°C, jsou výsledky pro každý izotyp následující:

Pozitivní A450	> 0.50
Slabě pozitivní A450	>0.30 až <0.50
Negativní A450	≤ 0.30

Pozn.: Pokud je pokojová teplota mimo doporučené rozmezí, hodnoty absorbance mohou být ovlivněny. Každá specifická pozitivní kontrola může být použita pro nastavení cut-off hodnoty. Leták, přiložený k soupravě uvádí hodnotu A450 pro pozitivní kontrolu použité šarže soupravy ZYMUTEST HIA a hodnotu v % této A450 odpovídající cut-off. Nastavená hodnota cut-off pak odpovídá % absorbance naměřené pozitivní kontrole v dané serii měření.

LIMITY TESTU:

Pokud není promývací krok správně proveden, negativní kontrola může mít vyšší hodnotu absorbance. Pokud se objeví nespecifické zbarvení, zkontrolujte správnost provedení promývacího kroku.

Tak jako jiné testy na přítomnost autoprotilátek, může mít na výsledek vliv konkrétní klinická situace, jako např. přítomnost zánětu, infekční onemocnění, autoimunní choroby, přítomnost imunních komplexů. Pak se zvyšuje pozadí (background) a výsledek může být v šedé zóně nebo slabě pozitivní. Zkontrolujte možnou přítomnost protilátek jiným vzorkem odebraným později.

Chybný výsledek může též způsobit bakteriální kontaminace testovacích materiálů, nedodržená inkubační doba, špatně promytí nebo odsátí jamek, vystavení substrátu slunečnímu světlu, vynechání testovací reagenty, vystavení příliš vysoké nebo nízké teplotě během testu nebo vynechání testovacího kroku.

Výsledek tohoto testu by neměl být použit jako jediný pro klinické rozhodování.

Ačkoliv pozitivní reakce získaná tímto testem může být známkou přítomnosti heparin-dependentních protilátek, detekce takové protilátky ještě nepotvrzuje diagnózu heparinem indukované trombopenie (HIT). Někteří pacienti mohou mít přirozeně se vyskytující protilátky proti PF4 nebo jiným chemokinům.

PATOLOGIE:

Heparin-dependentní protilátky jsou imunoglobuliny přítomné v plazmě pacientů s podezřením na Heparinem indukovanou trombocytopenii (HIT) typu II.

HIT typu II (imunoalergický typ) se objevuje během terapie heparinem (1-2) jako největší komplikace této léčby.

Je způsobena vznikem protilátek proti makromolekulárnímu komplexu heparin-protein (obvykle destičkový faktor 4) (3-4). Navíc jsou u některých nemocných nacházeny také protilátky proti komplexu heparin-PF4, proti dalším chemokinům jako Neutrofil-aktivační peptid (NAP2) a Interleukin-8 (IL-8) (5).

Vznik patologie je spojen zejména s heparin-dependentními protilátkami izotypu IgG. Přesto je pro zhodnocení rizika vzniku komplikací HIT informace o izotypech IgG,A,M užitečná jako prognostický faktor rozvoje této komplikace.

Když se HIT vyskytne poprvé, zánětlivým mechanismem, cestou aktivace destiček nebo ve spojení s chirurgickým zákrokem, vede k uvolnění chemokinů a tak podporuje vytvoření heparinových komplexů s chemikiny (obvykle PF4). Tyto multimolekulární komplexy se mohou stát antigeny a vést ke vzniku heparin-dependentních protilátek. Heterogenita těchto protilátek může částečně vysvětlit některé diskrepance mezi klinickým podezřením na HIT a biologickými testy (6).

Často mohou být heparin-dependentní protilátky asymptomatické, zejména pokud jsou IgM izotypu. Rozvoj kliniky je častější s vyšší koncentrací protilátek a s IgG izotypem těchto protilátek.

PODOBŇÉ TESTY:

Různé třídy protilátek mohou být měřeny globálně za použití screeningového testu ZYMUTEST HIA IgGAM (RK040D/RK041D Monostrip) pro odhad rizika rozvoje HIT a nemocných léčených heparinem: přítomnost protilátek je indikátorem rizika rozvoje HIT.

KONFIRMACE POZITIVNÍCH VZORKŮ (pokud je požadována):

Pokud je požadováno, mohou být pozitivní vzorky konfirmovány inhibováním jejich vazby za přítomnosti heparinu. Pro tuto konfirmaci k 500 µl vzorku ředěného 1:100 přidejte 10 µl roztoku nefrakcionovaného heparinu o koncentraci 100 IU/ml a promíchejte. Tento heparinovaný roztok (2 IU/ml finální koncentrace) pak musí být znovu testován. Vazba heparin-dependentních protilátek na destičku je inhibována (pokles absorbance více než o 50%) ve většině případů. Tato inhibice potvrdí na heparinu závislou vazbu protilátek. Ve vzácných případech mohou být vzorky pozitivní v nepřítomnosti buněčného lysátu. U těchto vzorků pak není výše uvedená inhibice pozorována a test se jeví jako pozitivní v přítomnosti i nepřítomnosti heparinového diluentu. Takový výsledek (dle současných znalostí nejasný) musí být považován za neprůkazný a interpretován společně s jinými testy nebo kritérii pro stanovení diagnózy HIT.

SPECIFITA A CHRAKTERISTIKA:

Tento optimalizovaný test je vytvořen s biologicky dostupným imobilizovaným heparinem, stabilizovaným a saturovaným, což umožňuje plnou vazbu heparin-vazných proteinů a protilátek. Tato spolehlivá metoda má vysokou reprodukovatelnost pro identifikaci IgG typu heparin-dependentních protilátek díky napodobení mechanismu vazby protilátek in vivo, v přítomnosti heparinu a buněčných povrchů - zejména destiček a endotelií.

INTERFERENCE:

Nejsou žádné interference s Heparinem až do hladiny 1 IU/ml

ZHODNOCENÍ PROVEDENÍ:

Externí studie: Zymutest IgG versus Serotonin Release Assay (SRA) pro n=174 vzorků. Porovnání ukazuje, že oba testy byly pozitivní nebo negativní.

Porovnáno	131
% shody	75,29

Dvoukroková externí studie: Zymutest IgG versus Asserachrom pro n=243 vzorků

	Asserachrom	
	Pozitivní	Negativní
Zymutest IgG	33	17
	42	151
Shoda	76%	
Co-pozitivita	44%	
Co-negativita	90%	
Počet vzorků	243	

Příklad reprodukovatelnosti dat:

Vzorek	Intra assay			Inter assay		
	N	A450	CV%	N	A450	CV%
IgG pozitivní kontrola	6	1.31	3.07%	7	1.34	7.11%

REFERENCES:

- 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, Briday 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, Briday 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.