

**ZYMUTEST™ HIA MonoStrip IgG**
(Heparin Induced Antibodies)Ref RK041A
(32 testů)

Revize: 10.2025, verze 5

POUŽITÍ:

ELISA manuální metoda pro in vitro kvantitativní měření Heparin závislých protilátek (IgG) v lidské citrátové plazmě a séru. Tato metoda je určena jako doplňková pro diagnózu heparin závislých protilátek u pacientů s podezřením heparin indukovanou trombocytopenii (HIT) nebo trombózu (HIT/T).

Pouze pro in vitro diagnostiku v laboratoři vyškoleným personálem.

SHRNUTÍ:**Technické^{4,6}:**

Reagencie je vytvořená, aby dynamicky napodobovala mechanismus in vivo heparin závislých protilátek.

Tto protilátky reagují s heparin proteinovým komplexem (hlavně Destičkovým faktorem 4 – PF4) přítomným na povrchu buněk, zejména destiček a endoteliálních buněk. Test má biologický přístupný heparin na microELISA destičce, s limitním množstvím protamin sulfátu jako kotvou; destička je poté saturována.

Vzorek (plazma nebo sérum) je pipetována do mikrodestiček spolu s buněčným lyzátem (jako zdroj PF4 a dalších destičkových proteinů). Když jsou přítomny protilátky, vytvářejí komplex s heparinem a PF4 (nebo jinými heparin vázajícími proteiny) v patogenních místech, kde jsou destičky aktivovány a vypouštějí svůj obsah, podobně jako při in vivo aktivaci.

Imnoassay detekuje heparin závislé protilátky a dovoluje klasifikaci měřených vzorků jako negativní, slabě pozitivní nebo pozitivní.

Klinické¹⁻⁸:

Heparin závislé protilátky jsou přítomny u pacientů s Heparin indukovanou Trombocytopenií (HIT), nežádoucí imunitní reakce, která se může objevit až u 5% pacientů užívající heparinové produkty, nejvíce pak Nefrakcionovaný heparin. Je to závažná komplikace u antikoagulační terapie. Je charakterizovaná trombocytopenií, většinou mírnou. U jedné třetiny až poloviny pacientů s HIT se vyvinou thromboembolické komplikace (HIT/T), v závislosti na klinickém profilu pacienta – nižší pravděpodobnost u pacientů na Nizkomolekulárním heparinu (LMWH) než na Nefrakcionovaném heparinu (UFH), nejméně pravděpodobné pak u pacientů s Fondaparinuxem.

HIT je způsobena získanou autoimunitou na heparin-protein makromolekulární komplex (většinou PF4). Protilátky proti dalším chemokinům (Neutrofil aktivací peptid – NAP2, interleukin-8 – IL8), nebo Protaminovým sulfátem) byly zjištěny u některých pacientů. Klinické komplikace HIT jsou způsobeny vytvořením heparin-závislých protilátek IgG isotypu, hlavně při vyšších koncentracích léčiva. Měření globálních HIA protilátek IGAM (RK040D – ZYMUTEST™ HIA IGAM) může být užitečné pro kvantifikaci rizika HIT komplikací. IgM a IgA protilátky jsou většinou asymptomatické.

Klinická diagnóza HIT je náročná, hlavně u pacientů s vysokým počtem trombocytopenie. Heterogenita těchto protilátek může částečně vysvětlit diskrepance mezi klinickým podezřením HIT a laboratorními testy. Další možné příčiny trombocytopenie by měly být při diagnóze vyloučeny. Heparin závislé protilátky, včetně IgG isotypy, jsou často asymptomatické, a HIT diagnóza musí být ověřena funkčními testy.

PRINCIP:

Ředěná testovaná plazma nebo sérum se pipetuje do jamky destičky, na jejíchž stěnách je navázán nefrakcionovaný heparin, a do které je v předchozím kroku přidán buněčný lyzáat. 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 specifického imunokonjugátu, který je tvořen kozí polyklonální protilátkou proti lidskému IgG (Fc γ specifické) a peroxidázou (HRP). Tento imunokonjugát reaguje specificky s IgG. Následuje další promytí. Potom se přidá peroxidázový substrát – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB MonoStrip), 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 tříd IgG přítomných v testovaném vzorku.

REAGENCIE:

- COAT MonoStrip: Micro ELISA destička 4x8**, obsahuje 4 proužky po 8 jamkách, potažených cca 10 IU/ml nefrakcionovaného heparinu, saturovaného a stabilizovaného. Destička je balená v hliníkovém pouzdru hermeticky uzavřeném společně s desikantem. Obsahuje Protamine sulfát a produkty zvířecího původu.
 - SD MonoStrip: HIA diluent vzorku**, 2 lahvičky s 12 ml; připraveno k použití. Obsahuje produkty zvířecího původu, konzervanty a stabilizátory.
 - C+ MonoStrip IgG: HIA IgG pozitivní kontrola**, 4 lahvičky po 0,5 ml, lyofilizováno. Obsahuje chimerní PF4 IgG, přibližně 4 μ g/ml, BSA a stabilizátory.
 - C- MonoStrip: Negativní kontrola**, 4 lahvičky po 0,5 ml, lyofilizováno. Obsahuje ředěnou lidskou plazmu a stabilizátory.
 - Cly MonoStrip: Buněčný lyzáat**, 4 lahvičky po 0,5 ml, lyofilizováno. Obsahuje lyzáat lidských destiček, BSA a stabilizátory.
 - IC ANTI-(h)-IgG MonoStrip HRP: Anti-(h)-IgG(Fc γ)-HRP imunokonjugát**, při přibližně 0,3 μ g/ml; 4 lahvičky po 2 ml kozí polyklonální protilátky specifické na Fc γ lidského IgG, spojené s křenovou peroxidázou (HRP), lyofilizováno. Obsahuje BSA, sodnou sůl 4-Aminobenzoické kyseliny a stabilizátory.
 - CD MonoStrip: Diluent konjugátu**, 1 lahvička po 10 ml, připraveno k použití. Obsahuje BSA, směs 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-jedna a 2-methyl-2H-isothiazol-jedna (3:1), konzervanty a stabilizátory.
- Varování!** H317: Může způsobit alergickou kožní reakci.
- WS MonoStrip: Proplachovací roztok**, 2 lahvičky po 12 ml, 20x koncentrovaná. Obsahuje směs 5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-jedna a 2-methyl-2H-isothiazol-jedna (3:1), konzervanty a stabilizátory.
 - TMB MonoStrip: 3,3', 5,5' – Tetramethylbenzidin**, 1 lahvička po 10 ml, připraveno k použití. Obsahuje konzervanty a stabilizátory.

10. Stop MonoStrip: 0,45M Kyselina sírová, 1 lahvička po 3 ml, připravena k použití.

Positivní kontroly mohou mít rozdílné hodnoty mezi šaržemi reagensů. Pro měření viz přesně hodnoty uvedené v letáku v balení reagensie.

BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ:

- Reagensie jsou vyrobeny z materiálu lidského a zvířecího původu. Lidská plazma použitá k výrobě byla testována a sledována negativně na protilátky HIV 1, HIV 2 a HCV a povrchový antigen hepatitidy B. Žádná testovací metoda nedokáže plně zaručit bezinfekčnost materiálu. Proto považujte reagensie jako materiál potenciálně infekční a zacházejte s ním dle všech potřebných bezpečnostních opatření.
- Odpadní materiál likvidujte dle místních platných regulací.
- Používejte pouze reagensie jedné šarže.
- Závažné závady hlasejte výrobci nebo jeho zástupci ve Vašem regionu.
- Shrnutí Bezpečnosti a Výkonu (SSP) je k dispozici na stránkách Evropské databáze zdravotnických zařízení (Eudamed).
- Pokud substrát **TMB MonoStrip** zežloutne, je přítomná kontaminace. Obsah znehodnoťte a načněte novou lahvičku.
- Viz Bezpečnostní data pro reagensii.
- **CD MonoStrip, WS MonoStrip:** Při potřísnění kůže opláchněte velkým množstvím vody. V případě podráždění nebo ekzému vyhledejte lékařskou pomoc.
- Používejte náležitě ochranné prostředky při manipulaci s reagensii.

PŘÍPRAVA REAGENCIÍ:

Nejméně 30 minut před použitím soupravu zahřejte na pokojovou teplotu. Při otevírání opatrně odejměte zátku, abyste předešli ztrátě prášku.

COAT MonoStrip Otevřete hliníkové pouzdro a vyndejte potřebný počet proužků. Proužky použijte do 30 minut.

Rozpusťte obsah každé lahvičky s přesně:

C+ MonoStrip IgG	0,5 ml SD MonoStrip Získaná pozitivní kontrola je připravena k použití a odpovídá plazmě obsahující IgG isotyp HIA protilátky, naředěný 1:100 . Protřepejte do úplného rozpuštění.
C- MonoStrip	0,5 ml SD MonoStrip Získaná negativní kontrola je připravena k použití a odpovídá normální lidské plazmě, naředěné 1:100 . Protřepejte do úplného rozpuštění.
Cly MonoStrip	0,5 ml destilované vody Protřepejte do úplného rozpuštění.
IC ANTI-(h)-IgG MonoStrip HRP	2 ml CD MonoStrip, alespoň 15 min před použitím Nechte pilulku úplně rozpustit. Protřepejte, abyste homogenizovali obsah.

SD MonoStrip, TMB MonoStrip, Stop MonoStrip, CD MonoStrip
Reagensie jsou připraveny k použití.

WS MonoStrip

Protřepejte lahvičku a naředte obsah **1:20 v destilované vodě** (12 ml vystačí na 240 ml promývacího roztoku). Inkubujte ve vodní lázni na **37°C**, dokud se úplně nerozpustí pevné částičky.

V originálním balení, pokud jsou skladovány v 2-8°C podle doporučení a protokolů může být souprava použita během 2 měsíců postupně, jak bude zapotřebí.

SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Neotevřené reagensie mohou být skladovány při 2-8°C v originálním balení do doby expirace uvedené na obalu.

Stabilita reagensie po rozpuštění, bez kontaminace a odpařování, pokud je reagensie skladována uzavřená, je:

C+ MonoStrip IgG, C- MonoStrip, Cly MonoStrip

- **2 týdny** při 2-8°C
- **60 dní** zmražené při -20°C nebo méně*

IC ANTI-(h)-IgG MonoStrip HRP

- **4 týdny** při 2-8°C
- **24 hodin** při 18-25°C
- **60 dní** zmražené při -20°C nebo méně*

*Rozmrazujte pouze jednou, co nejrychleji při 37°C a ihned použijte.

Stabilita reagensie po rozpuštění, bez kontaminace a odpařování, pokud je reagensie skladována uzavřená, je:

SD MonoStrip, CD MonoStrip, TMB MonoStrip, Stop MonoStrip

- **8 týdnů** při 2-8°C

WS MonoStrip

- **8 týdnů** při 2-8°C
- **7 dní** při 2-8°C pro naředěnou reagensii 1:20.

REAGENCIE A VYBAVENÍ POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

- **1-kanálové pipety** s objemy 0 až 20 µl, 20 až 200 µl, 200 až 1000 µl.
- **Čtečka mikro ELISA destiček** s vlnovou délkou 450 nm.

ODBĚR VZORKU:

Odběr, přípravu a skladování vzorku plazmy chudé na destičky (PPP) nebo séra provádějte dle laboratorních nebo jiných validních metod^{9,10}.

Krev (9 dílů) musí být odebrána do citrátu sodného (1 díl; 0,109M, 3,2%) přímou venepunkcí; sérum do tubičky bez antikagulans. CLSI GP44-A4⁹ a H21-A5¹⁰.

- Sérum/plazma by neměly být při pokojové teplotě déle jak 8 hodin.
- Pokud nebudete měření provádět do 4 hodin po odběru, vzorek zmrazte při -20°C nebo méně.
- Vzorky pak rozmrazujte při 37°C pouze jednou.

PROVEDENÍ:

Testovaná plazma, vzorek kontroly:

Kontroly jsou již ředěné (**1:100**) a připravené k použití.

Vzorky ředte s **SD MonoStrip** podle tabulky níže:

Vzorek	Ředící poměr
Plazma	1:100
Sérum	1:100

Postup:

Vyjměte proužky z hliníkového pouzdra a vložte je do přiloženého rámečku. Do jamek ELISA destičky pak pipetujte reagensie dle následujícího postupu:

Reagent	Objem	Testovací krok
Cly MonoStrip	50µl	Pipetování Cly MonoStrip do jamek mikrotitrační destičky
C+ MonoStrip IgG nebo C- MonoStrip nebo 1:100 ředěný vzorek nebo SD MonoStrip (blank)	200 µl	Přidání zředěné: C+ MonoStrip IgG nebo C- MonoStrip nebo ředěné vzorky nebo SD MonoStrip vzorku do jamek ELISA destičky (a)
Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b, d)		
WS MonoStrip	300 µl	provedte 5 promývacích cyklů (c)
IC ANTI-(h)-IgG MonoStrip HRP	200 µl	ihned po promytí pipetujte do jamek imunokonjugát (c)
Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b, d)		
WS MonoStrip	300 µl	Provedte 5 promytí (c)
TMB MonoStrip	200 µl	Ihned po promytí pipetujte

		substrát do jamek Pozn.: pipetování substrátu, řádek za řádkem musí být v přesných časových intervalech (c, e)
Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b, d)		
Stop MonoStrip	50 µl	Pipetujte ve stejných časových intervalech jako substrát, přidáním 0,45 M kyseliny sírové zastavíte rozvoj barvy (e)
Počkejte 10 minut , aby se zbarvení stabilizovalo a měřte absorpční při 450 nm (A450) (f) . Odečtěte hodnotu blanku.		

- Pipetujte kontroly a vzorky co nejrychleji (během 10 sekund), abyste získali homogenní imunologickou kinetiku vázání protilátek. Příliš dlouhá prodleva mezi první a poslední jamkou může ovlivnit výsledky měření.
- Nenechávejte destičku v přímém slunečním svitu během inkubace a vývoji barvy.
- Nenechávejte jamky prázdné mezi přidáváním reagensů a promýváním. Další reagensie musí být přidána do 3 minut, aby destička nevyschla a nebyly by poškozeny zafixované komponenty, a tak snížena reaktivita. Dle potřeby nechte v jamkách Promývací roztok a vyprázdněte destičku těsně před přidáním reagensů.
Jamky promývejte opatrně, abyste nepoškodily zafixované elementy.
- Inkubace provádějte při 20°C ±1°, abyste nemuseli upravovat mezní hodnoty výsledků.
- Přidání substrátu a Stop musí být provedeno v přesných časových intervalech.
- Pro bichromatické měření je referenční vlnová délka mezi 620 a 690 nm.

KONTROLA KVALITY:

Kontrola kvality umožňuje validaci metody a homogenity měření pro jednu šarži reagensie.

Proveďte kontrolu kvality pro každou sérii testů dle laboratorních doporučení.

Každá laboratoř si musí stanovit přijatelné rozmezí a verifikovat výsledky pro svůj analytický systém. Pro automatizované metodu musí být provedena studie pro validaci výkonu dle standardů.

VALIDACE:

- Kontroly v soupravě umožňují validaci výkonu měření.
- Předpokládané absorbance (A450) pro pozitivní a negativní kontroly se mohou lišit mezi šaržemi, ale v správných podmínkách měření (18 – 25°C) jsou:

$$P = A_{450} \text{ pro } C+ 1:1 \geq 1,0$$

$$N = A_{450} \text{ pro negativní kontrolu: } \leq 0,25$$

Získané hodnoty P a N, při 20 ±1°C jsou vyznačeny na letáku přiloženém v balení.

Hodnoty získané při A450 se mohou lišit v závislosti na teplotě během měření.

VÝSLEDEK:

- Pokud je měření prováděno při 20 ±1°C, výsledky A450 jsou přímo odečteny následovně, bez matematických úprav:

$$\text{Pozitivní} \quad A_{450} > 0,50$$

$$\text{Slabě pozitivní} \quad 0,30 < A_{450} \leq 0,50$$

$$\text{Negativní} \quad A_{450} \leq 0,30$$

- Pokud je teplota při měření mimo výše uvedené rozmezí, získané absorbance se mohou lišit. Použijte následující matematickou úpravu:

Pozitivní kontrolu použijte na úpravu cut-off hodnoty. V letáku přiloženém v balení má A_{450nm} při 20 ±1°C pro pozitivní kontrolu a procentuální hodnotu cut-off. Tuto hodnotu lze použít pro úpravu naměřené A450 hodnoty pozitivní kontroly na úpravu cut-off.

- Variabilita mezi šaržemi, měřená na 3 šaržích, je: %CV ≤ 10% (pozitivní kontrola).
- Výsledky by měly být interpretovány dle klinického a biologického stavu pacienta a ostatních výsledků měření.

LIMITY TESTU:

- Optimální výkon testu a dodržení specifikací je možné získat dle validovaných technických instrukcí výrobce Hyphen BioMed.
- Jakékoliv reagensie s neobvyklým vzhledem nebo projevující známky kontaminace musí být vyřazeny.
- Jakákoliv plazma s koagulátem nebo projevující známky kontaminace musí být vyřazena.
- Pokud není promývací krok správně proveden, negativní kontrola může mít vyšší hodnotu absorbance. Pro zamezení nespecifického 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.
- Chybné výsledky mohou být také z důvodu bakteriální kontaminace testovaného materiálu, neadekvátní inkubační doby, špatném promytí, vystavení destičky přímému světlu, opomenutí přidání reagensie, vystavení vyšší nebo nižší teplotě, než je uvedeno nebo vynechání některého kroku.
- Ačkoliv pozitivní reaktivita získaná tímto testem může znamenat přítomnost heparin-závislých protilátek, detekce takové protilátky nepotvrzuje diagnózu HIT.
- Někteří pacienti mohou mít přirozené protilátky proti PF4 nebo jiným chemokinům.
- Dle principu metody vzorky s IgG anti-protamin-sulfátu nebo anti-protamin-sulfát-heparin mohou být označeny jako pozitivní⁸.

PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY:

Referenční interval absorbance, stanovené v interní studii, se vzorky zdravých lidí (n=149) měřené manuální metodou byly stanoveny mezi 0,02 a 0,19 (Centrální 90%, 95 percentil)¹¹.

Každá laboratoř si musí stanovit vlastní přijatelné rozmezí.

Absorbance pro postiženou populaci jsou přepočítané na 0,30.

CHARAKTERISTIKA

Studie výkonu byly provedeny a výsledky posouzeny v softwaru dle CLSI směrnice.

Následující data reprezentují typické výsledky, ale nejsou specifikací pro ZYMUTEST™ HIA MonoStrip IgG.

Analytický výkon

Limit detekce (LOD)

Interní studie zjistila LOD na 0,036 (A540nm).

Přesnost

Vzorek	Opakovatelnost (n = 80)	
	Průměr (A450)	CV/ SD
HIA IgG C+	1,49	CV = 2,7%
C-	0,04	SD = 0,005
HIT IgG pozitivní vzorek	0,93	CV = 3,6%
Reprodukovatelnost (n = 75)		
Vzorek	Průměr (A450)	CV/ SD
HIA IgG C+	1,34	CV = 5,8%
C-	0,05	SD = 0,01
HIT IgG pozitivní vzorek	0,83	CV = 9,5%

Interference

Nebyly zjištěny žádné interference do koncentrací:

Revmatoidní faktor	UFH	LMWH
800 IU/ml	2,5 IU/ml	2,5 IU/ml

Klinický výkon

Klinické studie, provedeny na 153 vzorcích od zdravých jedinců (82) a pacientů s HIT (71).

Shoda

Isotyp	N	Referenční metoda	Shoda
IgG	153	IgG s PF4 IgG měřením (IMMUNOR)	96,1%

Citlivost/Specifita

Isotyp	N	Citlivost	Specifita	Prostor pod křivkou (ROC)	
				LR+	LR-
IgG	153	93%	97%	0,987	
Isotyp	N	PPV	NPV	LR+	LR-
IgG	153	98%	96%	34,2	0,038

PPV = Prediktivní hodnota pozitivního výsledku

NPV = Prediktivní hodnota negativního výsledku

LR+ = Poměr pravděpodobnosti +

LR- = Poměr pravděpodobnosti -

REFERENCE:

- Cuker A. *et al.* American Society of Hematology 2018 guidelines for management of venous thromboembolism: heparin-induced thrombocytopenia. Blood advances. 2018.
- Warkentin TE *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 heparin 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.
- Amiral J. and Seghatchian J. An update on evidence based diagnostic and confirmatory testing strategies for heparin induced thrombocytopenia using combined immunological and functional assays. Elsevier. 2018.
- Marchetti M. *et al.* Heparin-Induced Thrombocytopenia: A Review of New Concepts in Pathogenesis, Diagnosis, and Management. Journal of Clinical Medicine. 2021.
- Panzer S. *et al.* Serological features of antibodies to protamine inducing thrombocytopenia and thrombosis. Clin Chem Lab Med. 2014.
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".
- CLSI Document H21-A5: "Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma -based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline". 2008.
- CLSI Document EP28-A3c: "Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline – Third Edition". 2010.

REF Katalogové číslo	LOT Číslo šarže	IVD In Vitro diagnostický prostředek
Rx Numerický identifikátor reagencie Teplota	i Viz návod k použití	WHO STD WHO kód standardu Expirace
CE CE značka s číslem certifikovaného orgánu	→ Výrobce	YYYY-MM-DD Expirace
Cx Numerický identifikátor kontrol	i-MA Rekonstituční objem	CONTENTS Obsah
EXP Doba Expirace	i-MA Viz aplikační protokol	CONTAINS Obsahuje
TARGET VALUE Cílová hodnota	Σ Počet testů	UNIT Jednotky
UDI Identifikátor produktu	☀ Skladujte mimo sluneční světlo	CALx Numerický identifikátor kalibrátoru
DANGER Nebezpečí	BIO Obsahuje materiál biologického původu	☀ Obsahuje lidskou plazmu nebo deriváty
☠ Biologické riziko	WARNING Varování	UK CA UKCA značení konformity
	ACCEPTANCE RANGE Přijatelné rozmezí	