



# ZYMUTEST HIA MonoStrip IgGAM Ref RK041D (32 testů)



www.hyphen-biomed.com

155, rue d'Eragny  
95000 NEUVILLE SUR OISE  
FRANCE  
Tel. : +33 (0)1 34 40 65 10  
Fax : +33 (0)1 34 48 72 36  
info@hyphen-biomed.com

IVD

Kvalitativní test pro detekci heparin-dependentních  
protilátek typu IgG, IgM a IgA ELISA metodou

Revize:12.2017

## POUŽITÍ:

ZYMUTEST HIA IgGAM souprava pro ELISA test je kvalitativní test určený pro detekci heparin-dependentních protilátek, nezávisle na třídě (IgG, IgA, IgM), v lidské plazmě, séru nebo v jakékoliv další tělní tekutině, kde je zapotřebí určovat tyto protilátky. Každá souprava umožňuje provést 4 série po 8mi testech (C+, C-, vzorek a blank v duplikátech) a nabízí možnost jednotlivých testů.

## INFO:

ZYMUTEST HIA IgGAM souprava je určená pro měření lidských heparin-dependentních protilátek IgA, IgG a IgM. Tento test obsahuje biologicky přístupný fixovaný heparin, který je stabilizován a saturován pro celkovou reaktivitu s vázacími proteiny a protilátkami. Tato metoda je spolehlivá a poskytuje vysokou reprodukovatelnost, vysokou citlivost a specifitu díky identifikaci isotopů heparin závislých protilátek a napodobováním vázacích mechanismů protilátek na heparin na povrchu destiček a endotelálních buněk in vivo.

## PRINCIP:

Ředěná testovaná plazma nebo sérum se pipetuje do jamky destičky, na jejichž stěnách je navázán nefrakcionovaný heparin, a do které je v předchozím kroku přidán buněčný lysát. Pokud jsou přítomny heparin-dependentní protilátky třídy IgG, IgA nebo IgM, vytvoří komplexy s biologicky dostupným nefrakcionovaným heparinem, vázaným na destičce. Následuje další promytí. Navázané protilátky jsou potom detekovány pomocí specifického imunokonjugátu, který je tvořen 3mi kozími polyklonálními protilátkami proti lidskému IgG (Fc $\gamma$  specifické), IgM ( $\mu$  specifické), IgA ( $\alpha$  specifické) a peroxidázou (HRP). Tento imunokonjugát reaguje specificky a stejnoměrně s IgA, IgG a IgM. Následuje další promytí. Potom se přidá peroxidázový substrát – Tetramethylbenzidin (TMB), který v přítomnosti peroxidu vodíku (H $_2$ O $_2$ ) vytvoří modré zbarvení. Po zastavení kyselinou sírovou se barva změní na žlutou. Intenzita zbarvení je přímo úměrná množství heparin-dependentních protilátek tříd IgG, IgA, IgM přítomných v testovaném vzorku.

## REAGENCIE:

- COAT: Micro ELISA destička**, obsahuje 4 proužků po 8 jamkách, potažených nefrakcionovaným heparinem biologicky dostupným, saturovaným a potom stabilizovaným. Destička je balená 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. Po rozpuštění s **0,5 ml HIA diluentu vzorku** se získá pozitivní kontrola připravená k použití (již ředěná 1:100).  
Předpokládaná reaktivita (OD $_{450nm}$ ) je uvedena na letáku dodaném se soupravou.
- 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). Obsahuje BSA.
- CLy:** 4 lahvičky **buněčného lysátu**, lyofilizovaného (ředěná normální lidská plazma). Po rozpuštění s **0,5 ml destilované vody** se získá reagentie připravená k použití. Obsahuje BSA.
- IC:** 4 lahvičky specifického **imunokonjugátu (Anti-IgG(Fc $\gamma$ )-IgM( $\mu$ )-IgA( $\alpha$ )-HRP imunokonjugát)**, lyofilizované kozí protilátky specifické pro lidský Fc $\gamma$ ,  $\alpha$  a  $\mu$  spárované s HRP lidské IgG-IgA-IgM. Po rozpuštění s **2 ml diluentu konjugátu (CD)** se získá imunokonjugát připravený k použití. Obsahuje BSA.
- CD:** 1 lahvička 10 ml **diluentu konjugátu**, připraveného k použití. Obsahuje BSA.
- WS:** 1 lahvička 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.

SD reagentie obsahují malé koncentrace Azidu sodného (0,9 g/l) a SA reagentie obsahují kyselinu sírovou. Viz BEZPEČNOSTÍ UPOZORNĚNÍ.

## BEZPEČNOSTNÍ UPOZORNĚNÍ:

- Jedná se o produkt biologického původu, proto s ním musí být zacházeno s opatnostmi jako s potenciálně infekčním.
- Při kontaktu s měděným nebo olověným odpadním potrubím může azid sodný tvořit explozivní azidy kovů.
- V případě kontaminace se TMB substrát změní barvou na žlutou. V tomto případě musí být znehodnocen a musí se použít nová lahvička.
- Odpadní materiál zlikvidujte dle lokálních směrnic o zacházení s odpadem.
- Užívejte komponenty pouze z kity stejné šarže. Nezaměňujte komponenty z kity o různých šaržích v jednu testu.
- S reagentie zacházejte opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci během používání. Pokud je možné, snižte odpar reagentie zmenšením plochy kontaktu reagentie se vzduchem. Odpařování snižuje stabilitu reagentie v analyzátoru.
- Pro zajištění dostatečné stability uzavírejte lahvičky jejich vlastními zátkami, nebo je uchovávejte v uzavřených plastových mikrokumavkách, určených pro uchovávání plazmy.
- Studie stability trvající 3 týdny při 30°C prokázaly, že reagentie může být přepravována za pokojové teploty po krátký čas bez jejího poškození.
- Bovinní sérový albumin (BSA) byl připraven z bovinní plazmy, která byla testována na nepřítomnost infekčních agens a byla odebrána od zvířat bez BSE.
- I v nízkých koncentracích (0,45M) je kyselina sírová žíravina. Proto zacházejte s kyselinou sírovou opatrně, jako s podobnými chemikáliemi. Vyvarujte se kontaktu s očima a kůží.
- Pouze pro použití In Vitro.

## PŘÍPRAVA REAGENCIÍ, SKLADOVÁNÍ A STABILITA:

Nejméně 30 minut před použitím soupravu zahřejte na pokojovou teplotu. Nepoužité reagentie skladujte při 2 – 8 °C. Lahvičky jsou uzavřeny ve vakuu. Při otevírání opatrně odejměte zátku, abyste předešli ztrátě prášku.

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.

- COAT (ELISA mikrotitrační destička):** otevřete hliníkové pouzdro a vyjměte požadovaný počet 8-mi jamkových proužků pro analýzu. Pokud jsou mimo pouzdro, musí být testovací proužky použity do 30 minut. Nepoužité proužky mohou být skladovány v **2-8°C 8 týdnů** v jejich originálním hliníkovém pouzdru, za přítomnosti desikantu, hermeticky uzavřené, chráněné před vlhkostí a uložené v příloženém skladovacím pouzdru.
- SD (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 a odpařování během použití. Obsahuje Azid sodný.
- C+ (HIA pozitivní kontrola):** rozpusťte každou lahvičku **0,5 ml HIA diluentu vzorek** a promíchejte. Získaná kontrola je připravena k použití a odpovídá plazmě obsahující IgG-IgA-IgM heparin-dependentní protilátky, **již ředěné 1:100**.  
Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití je:
  - 2 týdny** při 2 – 8°C
  - 2 měsíce** při <= -20°C
- C- (Negativní kontrola):** rozpusťte každou lahvičku s **0,5 ml HIA diluentu vzorku** a promíchejte. Tak se získá negativní kontrola již připravená k použití. Odpovídá normální lidské plazmě, **již naředěné 1:100**.  
Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití je:
  - 2 týdny** při 2 – 8°C
  - 2 měsíce** při <= -20°C

Distributor: Diagnostica s.r.o., Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz), [www.diagnostica.cz](http://www.diagnostica.cz)



5. **CLy (buněčný lysát):** Rozpusťte každou lahvičku s 0,5 ml destilované vody a promíchejte. Získá se tak reagent připravený k použití.

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití je:

- 2 týdny při 2 – 8°C
- 2 měsíce při ≤ -20°C

6. **IC (Anti-IgG(Fcy)-IgM(μ)-IgA(α)-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.

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití je:

- 24 hodin při 18 – 25°C
- 4 týdny při 2 – 8°C
- 2 měsíce při ≤ -20°C

7. **CD (Diluent konjugátu):** Připraven k použití. Obsahuje 0,05% Kathon CG. Po otevření může být užíván po 8 týdnů, pokud je skladován při 2-8°C a je zabráněno bakteriální kontaminaci během použití.

8. **WS (Promývací roztok):** Inkubujte lahvičku 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).

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití je:

- Neředěný roztok: 8 týdnů při 2 – 8°C
- Ředěný roztok: 7 dní při 2 – 8°C

9. **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.

10. **SA (Zastavovací roztok):** Zastavovací roztok obsahuje 0,45M kyseliny sírové. Připraven k použití.

Stabilita reagentu po otevření, pokud je v originální lahvičce a je zabráněno jakémukoliv odpařování a kontaminaci během použití je:

- 8 týdnů při 2 – 8°C

#### SKLADOVACÍ PODMÍNKY:

Nepoužité reagenty skladujte při 2 – 8 °C v originálním balení. V doporučených skladovacích podmínkách je souprava použitelná do data spotřeby, uvedeného na obalu.

#### REAGENCIE A VYBAVENÍ POTŘEBNÉ, V KITU NEPŘÍTOMNÉ:

##### Reagencie:

Destilovaná voda.

##### Materiál:

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.

#### ODBĚR VZORKU:

Během přípravy a skladování vzorků dodržujte lokální předpisy (pro USA viz CLSI doc GP44-A4).

##### Vzorek:

Lidská plazma odebraná z citrátového antikoagulantu nebo EDTA lidská plazma. Skladovací podmínky jsou stejné jako s citrátovou plazmou. Heparin závislé protilátky mohou být testovány v séru. To je pak normálně připravené k testování. Sérum ze sraženiny stočte před použitím nebo mražením. Pro sérum jsou skladovací podmínky stejné jako pro plazmu.

##### Odběr

Krev (9 objemů) musí být odebrána do citrátu sodného (1 objem, 0,109M) přímou venepunkcí. První odebraná zkumavka by měla být znehodnocena.

##### Centrifugace

Do 2 hodin po odběru použijte metodu ve vaší laboratoři validovanou pro získání plazmy chudé na destičky, např. 15 minut při 2 500 g a v pokojové teplotě 18-25°C. Plazma musí být stočena do plastové zkumavky.

##### Skladování plazmy:

- 24 hodin při pokojové teplotě (18-25°C).
- 6 měsíce při -20°C

Vzorek plazmy rozmrazujte rychle při 37°C, promíchejte a testujte během 72 hodin. Zamíchejte po rozmražení a před testováním.

#### PROVEDENÍ:

##### Testovaná plazma, vzorek kontroly:

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

Vzorky ředte s SD (HIA diluent vzorku) podle tabulky níže:

| Vzorek              | Redicí poměr |
|---------------------|--------------|
| Plazma              | 1:100        |
| Sérum               | 1:100        |
| Biologická tekutina | 1:100        |

Pokud je očekávána vysoká hladina heparin-dependenčních protilátek, musí být vzorek testován v ředění 1:200 nebo 1:400 atd. Výsledek (odpovídající absorbanci) pak musí být násoben 2x nebo 4x atd.

#### Postup:

Vyjměte pro počet testů požadovaný počet proužků z hliníkového pouzdra a vložte je do přiloženého rámečku. Do různých jamek ELISA destičky pak pipetujte reagenty dle následujícího postupu:

| Reagent  | Objem         | Testovací krok   |
|--|---------------|--|
| CLy  | 50μl          | Pipetování CLy do jamek mikrotitrační destičky   |
| <b>Positivní kontrola, nebo negativní kontrola nebo 1:100 ředěný vzorek nebo HIA diluent vzorku (blank)</b>                | <b>200 μl</b> | Přidání zředěné: <b>pozitivní kontroly</b> nebo <b>negativní kontroly</b> nebo <b>ředěné vzorky</b> nebo <b>HIA diluenty</b> vzorku do jamek ELISA destičky <b>(a)</b> |
| <b>Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b)</b>   |               |  |
| <b>Promývací roztok</b> (20x ředěný destilovanou vodou)  | <b>300 μl</b> | provedte 5 promývacích cyklů za použití promývačky <b>(c)</b>  |
| <b>Immunokonjugát</b> (anti-IgG(Fcy)-IgA(α)-IgM(μ)-HRP imunokonjugát, naředěný 2 ml diluentu konjugátu)                    | <b>200 μl</b> | lhně po promytí se napipetuje do jamek ELISA destičky specifický imunokonjugát <b>(c)</b>  |
| <b>Inkubujte 60 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b)</b>   |               |  |
| <b>Promývací roztok</b> (20x ředěný destilovanou vodou)  | <b>300 μl</b> | Provedte 5 promytí za použití promývačky <b>(c)</b>  |
| <b>TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Substrát</b>   | <b>200 μl</b> | lhně po promytí pipetujte substrát do jamek <b>Pozn.:</b> pipetování substrátu, řádek za řádkem musí být v přesných časových intervalech <b>(c,d)</b>                  |
| <b>Inkubujte přesně 5 minut při pokojové teplotě (18-25°C) (b)</b>   |               |  |
| <b>0,45 M Kyselina sírová</b>  | <b>50 μl</b>  | Pipetujte ve stejných časových intervalech jako substrát, přidáním 0,45 M kyseliny sírové zastavíte rozvoj barvy <b>(c,d)</b>  |
| <b>Počkejte 10 minut, aby se zbarvení stabilizovalo a měřte absorbanci při 450 nm (A450) (e). Odečtěte hodnotu blanku.</b> |               |  |

#### Poznámky:

- 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 destičku prázdnou mezi přidáním reagentů nebo po promytí. Následující reagent musí být přidán do 3 minut, aby se zabránilo vyschnutí destičky – poškodilo by navázané komponenty. Pokud je nezbytné, udržujte destičku naplněnou promývacím roztokem a vyprázdněte až před pipetováním další reagenty. Promývačka musí být nastavena tak, aby promývala destičku jemně. Je nutné se vyhnout příliš energickému vyprázdnění jamek, aby se nesnižila reaktivita destičky.
- d) Pro přidání TMB substrátu – časové intervaly mezi pipetováním do řádků 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 absorpance při 450 nm pro pozitivní kontrolu a negativní kontrolu mohou jevit mírné odlišnosti od šarže k šarži, pokud je test proveden při teplotě 18-25°C.

Hodnoty jsou potom:

**P = OD<sub>450</sub> pro C+ (pozitivní kontrolu) 1:1: ≥ 1.0**

**N = OD<sub>450</sub> pro negativní kontrolu: ≤ 0.25**

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

Distributor: Diagnostica s.r.o., Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz), [www.diagnostica.cz](http://www.diagnostica.cz)



## 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:

|                        |                             |
|------------------------|-----------------------------|
| <b>Pozitivní</b>       | <b>A450 &gt; 0.50</b>       |
| <b>Slabě pozitivní</b> | <b>0.30 &lt;A450 ≤ 0.50</b> |
| <b>Negativní</b>       | <b>A450 ≤ 0.30</b>          |

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

## LIMITY TESTU:

- Pro získání optimálního výkonu testu, který dodržuje specifikace, procesní instrukce validované společností HYPHEN BioMed musí být striktně dodrženy. Jakékoliv změny instrukcí postupu musí být validovány laboratoři.
- Jakékoliv reagentie 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 zabarvení, 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 reagentie, vystavení vyšší nebo nižší teplotě než je uvedeno nebo vynechání některého kroku.
- Výsledek tohoto testu by měl být použit společně s posouzením klinického stavu.
- Ačkoliv pozitivní reaktivita získaná tímto testem může znamenat přítomnost s heparinem spojených protilátek, detekce takové protilátky nepotvrzuje diagnózu HIT.
- Někteří pacienti mohou mít přirozené protilátky proti PF4 nebo jiným chemokínům.

## 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 chemokínům 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 chemokínů a tak podporuje vytvoření heparinových komplexů s chemokiny (obvykle PF4). Tyto multimolekulární komplexy se mohou stát antigenními a vést ke vzniku heparin-dependentních protilátek. Heterogenita těchto protilátek může částečně vysvětlit některé rozdíly 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.

## POUŽITÍ:

- Klinické podezření HIT během léčby heparinem (nekróza kůže, propad počtu destiček <100, 10<sup>9</sup> G/L nebo víc jak 30% snížení mezi následovnými součty...). Další možné příčiny trombocytopenie by měly být prozkoumány a vyloučeny. V případě potvrzené trombocytopenie může pozitivní test potvrdit diagnostiku.
- Zavislé IgG isotypní protilátky heparinu jsou spojovány s lepší klinickou diagnózou HIT. ZYMUTEST HIA IgG (RK040A) souprava nabízí lepší specifitu klinických komplikací HIT, ale menší citlivost. Případy spojené s pouze IgM isotypy nebo IgA nejsou detekovány.

## SOUVISEJÍCÍ TESTY:

Konkrétně použití ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM (RK040E) umožňuje kompletní test isotypů heparin závislých protilátek. Tato souprava je proto vhodná pro výzkum nebo rozvoj HIT během léčby heparinem.

**Distributor:** Diagnostica s.r.o., Za Trať 686, Praha 9, Česká republika, tel.+420 266 315 909, Fax.+420 266 316 000, e-mail: [info@diagnostica.cz](mailto:info@diagnostica.cz), [www.diagnostica.cz](http://www.diagnostica.cz)

## KONFIRMACE POZITIVNÍCH VZORKŮ (pokud je požadována):

Pokud je požadováno, mohou být pozitivní vzorky konfirmovány inhibováním jejich vazby za přítomnosti heparinu. Pro tuto konfirmaci přidejte k 500 µl vzorku (plazma nebo sérum) ředěného 1:100 10 µl roztoku nefrakcionovaného heparinu o koncentraci 100 IU/ml a promíchejte. Tento heparinizovaný roztok (2 IU/ml finální koncentrace) pak musí být znovu testován. Vazba heparin-dependentních protilátek na destičku je inhibována (absorbance poklesne o víc než 50%) ve většině případů. Tato inhibice potvrdí na heparinu závislou vazbu protilátek.

Velmi vzácně je vzorek pozitivní i bez přítomnosti buněčného lysátu a tato inhibice pak není pozorována. Test je stále pozitivní v přítomnosti i absenci heparinu. Výsledek nedokážeme vysvětlit při současném stavu znalostí a musí být posuzován společně s dalšími kritérii pro diagnózu HIT.

## VIHODNOCENÍ:

- Neinterferuje heparin do 1 IU/ml.
- Vnitřní studie: Zymutest HIA IgGAM versus Asserachrom pro n=44 vzorků.

| Zymutest IgG | Asserachrom |           |
|--------------|-------------|-----------|
|              | Pozitivní   | Negativní |
|              | Pozitivní   | 28        |
| Negativní    | 0           | 14        |
| Souhlas      | 100%        | 88%       |

- Dvoustranná externí studie: Zymutest IgGAM versus Asserachrom pro n=243 vzorků:

| Zymutest IgG  | Asserachrom® HPIA |           |
|---------------|-------------------|-----------|
|               | Pozitivní         | Negativní |
|               | Pozitivní         | 48        |
| Negativní     | 27                | 136       |
| Shoda         | 76%               |           |
| Co-pozitivita | 64%               |           |
| Co-negativita | 81%               |           |
| Počet vzorků  | 243               |           |

- Trojstranná externí studie: Zymutest IgGAM versus GTI PF4 Enhanced pro n=345 vzorků:

| Zymutest IgG  | GTI PF4 Enhanced |           |
|---------------|------------------|-----------|
|               | Pozitivní        | Negativní |
|               | Pozitivní        | 101       |
| Negativní     | 74               | 153       |
| Shoda         | 73,62%           |           |
| Co-pozitivita | 57,71%           |           |
| Co-negativita | 90,00%           |           |
| Počet vzorků  | 345              |           |

## Příklad reprodukovatelnosti

| Vzorek               | Intra assay |      |      | Inter assay |      |      |
|----------------------|-------------|------|------|-------------|------|------|
|                      | N           | A450 | CV%  | N           | A450 | CV%  |
| IgGAM pozit kontrola | 9           | 1,74 | 4,75 | 7           | 1,84 | 7,50 |

## REFERENCES:

- Gruel Y. *et al.* Thrombopénie induite par les héparines manifestations cliniques et physiopathologie. Presse Med. 1998.
- 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 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".

## SYMBOLY:

Použité symboly jsou uvedené v ISO 15223-1 standart, viz dokument definice symbolů.

