



ZYMUTEST HIA IgG (# ARK040A)

Qualitative assay for the detection of heparin-dependent antibodies of the IgG isotype by ELISA



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For in vitro diagnostic use only

Last revision: 23/10/2007

INTENDED USE:

The ZYMUTEST HIA, IgG ELISA kit, is a qualitative assay intended for the detection of heparin-dependent antibodies of the IgG isotype, in human plasma, by clinical laboratories. It is intended for in vitro diagnostic use.

ASSAY PRINCIPLE:

The diluted assayed plasma sample is introduced into one of the microwells of the coated plate, and supplemented with a platelet lysate. When present, heparin-dependent antibodies, of the IgG isotype, form complexes onto the biologically available unfractionated heparin, immobilised and saturated. Following a washing step, bound antibodies are revealed with the immunoconjugate, which is made of goat polyclonal antibodies anti-human IgG (Fcγ specific)-peroxidase (HRP) conjugate. This immunoconjugate reacts specifically with IgG isotypes. Following a new washing step, the peroxidase substrate, Tetramethylbenzidine (TMB) in presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), is introduced and a blue colour develops. The colour turns yellow when the reaction is stopped with sulfuric acid. The colour developed is directly proportional to the amount of heparin-dependent antibodies, of the IgG isotype, present in the tested sample.

TESTED SAMPLES:

- Trisodium citrate anticoagulated human plasma.

REAGENTS:

- COAT:** Micro ELISA plate, containing 12 strips of 8 wells, coated with unfractionated heparin, biologically available, saturated, then stabilized; the plate is packed in an aluminium pouch hermetically sealed in presence of a desiccant.
- SD:** 2 vials containing 50 ml of HIA Sample Diluent, ready to use. Contains Sodium Azide
- C₊:** 3 vials of HIA IgG Positive control, lyophilised. When restored with 1 ml of HIA Sample Diluent, the ready to use positive control is obtained (already diluted 1:100). The expected reactivity is indicated on the flyer provided with the kit.
- C₋:** 3 vials of negative control, lyophilised (diluted normal human plasma). When restored with 1 ml of HIA Sample Diluent, the ready to use negative control is obtained (already diluted 1:100).
- CLy:** 3 vials of cell lysate, lyophilised (diluted normal human plasma). When restored with 2 ml of distilled water, the ready to use solution is obtained.
- IC:** 3 vials of immunoconjugate (Anti-IgG (Fcγ)-HRP immunoconjugate), goat antibodies specific for human IgG (Fcγ)- coupled to HRP, lyophilised. When restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent (CD), the ready to use immunoconjugate is obtained.
- CD:** 1 vial of 25 ml of conjugate diluent, ready to use.
- WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated Wash Solution.
- TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' – Tetramethylbenzidine containing hydrogen peroxide, ready to use.
- SA:** 1 vial of 6 ml of 0.45M Sulfuric Acid (Stop Solution), ready to use.

Note: Use only components from a same kit lot number. Do not mix components from different lots when running the assay.

REAGENTS AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT PROVIDED:

- 8-channel or repeating pipette allowing dispensing 50-300 µl.
- 1-channel pipettes at variable volumes from 0 to 20 µl, 20 to 200 µl and 200 to 1000 µl.
- Micro ELISA plate washing equipment (and shaker).
- Micro ELISA plate reader with a wavelength set up at 450 nm.
- Distilled water.

REAGENTS PREPARATION, STORAGE AND STABILITY:

In their original packaging box, before use, when stored at 2-8°C, the unopened reagents are stable until the expiration date printed on the box.

- Micro ELISA plate:** open the plastic pouch and take off the required amount of 8 well strips for the test series. When out of the pouch, the strips must be used within 30 minutes. Unused strips can be stored at 2-8°C for 8 weeks in their original aluminium pouch, in presence of the desiccant, hermetically closed and protected from any moisture, and stored in the provided microplate storage bag (minigrp).

- HIA Sample Diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 8 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that it remains protected from any bacterial contamination. This reagent contains sodium azide.

Warning: The HIA Sample Diluent contains sodium azide, which may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Flush with large volumes of water when discarding into a sink.

- HIA IgG Positive Control:** restore each vial with 1 ml HIA sample diluent in order to obtain the ready to use positive control. It corresponds to a plasma containing IgG isotype heparin-dependent antibodies, already diluted 1:100. Following reconstitution, the positive control is stable for 2 weeks at 2-8°C, provided that it remains protected from any bacterial contamination, or 2 months at -20°C or below.
- Negative control:** restore each vial with 1 ml HIA sample diluent in order to obtain the ready to use negative control. It corresponds to a normal human plasma, already diluted 1:100. Following reconstitution, the negative control is stable for 2 weeks at 2-8°C, provided that it remains protected from any bacterial contamination, or 2 months at -20°C or below.
- CLy:** restore each vial with 2 ml distilled water in order to obtain the ready to use reagent. Following reconstitution, the reagent is stable for 2 weeks at 2-8°C, provided that it remains protected from any bacterial contamination, or 2 months at -20°C or below.

Warning: The CLy used for the assay is extracted from fresh human platelet concentrates. The negative control is also prepared with human plasma, tested with registered methods and found negative for HIV antibodies, HBS Ag and HCV antibodies. However, no assay may warrant the total absence of infectious agents. Any product of human origin must then be handled with all the required cautions, as being potentially infectious.

- Anti-IgG (Fcγ)-HRP immunoconjugate:** each vial must be restored with 7.5 ml of conjugate diluent. Let the pellet to be completely dissolved before use, and shake the vial gently in order to homogenize the content. The restored conjugate is stable for at least 24 hours at room temperature or for at least 4 weeks at 2-8°C, or 2 months at -20°C or below.
- Conjugate diluent:** It is ready to use. When open, it can be used for 8 weeks, stored at 2-8 °C, and provided that it remains protected from any bacterial contamination. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
- Wash Solution:** Incubate the vial for 15-30 minutes in a water bath at 37°C until complete dissolution of solids, when present. Shake the vial and dilute the amount required 1:20 in distilled water (the 50 ml contained in the vial allow to prepare 1 liter of Wash Solution). The Wash Solution must be stored at 2-8°C in its original vial and used within 8 weeks following opening. The diluted Wash Solution must be used within 7 days, when protected from any contamination. This reagent contains 0.05% Kathon CG.
- TMB substrate:** It is ready to use. When open, it can be used for 8 weeks, stored at 2-8°C, and provided that it remains protected from any bacterial contamination.
- Stop solution:** It is ready to use.

Cautions: Sulfuric Acid, although diluted to 0.45M, is caustic. As for any similar chemical, handle Sulfuric Acid with great care. Avoid any skin and eye contact. Wear protection glasses and gloves when handling.

Note: Bring the kit at room temperature, at least 30 min. before use. Store the unused reagents at 2-8°C. The stability studies performed at 30°C show that the reagents keep their performances and can be shipped at room temperature without any damage. When appropriately used and stored, according to the recommended protocol and cautions, the kit can be used over a two month period, and strip by strip, if required.

PROCEDURE:

Sample collection:

Blood plasma (9 vol.) must be collected on 0.109M (or 0.129M) citrate anticoagulant (1 vol.); plasma supernatant is decanted following a 20 min. centrifugation at 2,500 g; citrated plasma should be tested within 24 hours or stored frozen at -20°C or below for up to 6 months, and thawed for 15 min. at 37°C just before use. Thawed specimen must be tested within 2 hours.

Tested plasma or sample or control:

Plasma is tested at 1:100 dilution in HIA Sample Diluent (SD). When high amounts of heparin-dependent antibodies are expected, samples must be assayed at 1:200 or 1:400 dilution, etc.... Results (corresponding absorbance) must then be multiplied by 2 or 4, etc....

Controls are ready to use (already diluted 1:100).

Assay procedure:

Remove the required number of strips from the aluminium pouch, for the series of measures to be performed. Then put the strips in the frame provided. In the different wells of the micro ELISA plate introduce the reagents and perform the various assay steps as indicated on the following table:

D.750.02/ZY/040A



6560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Reagent	Volume	Procedure
CLy	50µl	Introduce the CLy into the micro ELISA plate wells (a)
IgG Positive control or Negative control or 1:100 diluted sample or sample diluent (blank)	200 µl	Introduce the : – IgG Positive control or – negative control or – diluted sample or – sample diluent into the micro ELISA plate wells (a)
Incubate for 60 minutes at room temperature (18-25 °C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
Conjugate (anti-IgG (Fcγ)-HRP immunoconjugate, restored with 7.5 ml of conjugate diluent)	200 µl	Immediately after the washing, introduce the immunoconjugate in the micro ELISA plate wells(c)
Incubate for 60 minutes at room temperature (18-25 °C) (b)		
Wash Solution (20 fold diluted in distilled water)	300 µl	Proceed to 5 successive washings using the washing instrument (c).
TMB/H ₂ O ₂ Substrate	200 µl	Immediately after the washing, introduce the substrate into the wells. Note: The substrate distribution, row by row, must be accurate and at exact time intervals (c,d)
Let the colour develop for exactly 5 min. at room temperature (18-25 °C) (b)		
0.45M Sulfuric Acid	50 µl	Following exactly the same time intervals than for the addition of substrate, stop the colour development by introducing the 0.45M Sulfuric Acid (c,d)
Wait for 10 minutes in order to allow the colour to stabilize and measure absorbance at 450 nm (A450) (e). Subtract the blank value.		

Note:

- a) Distribute controls and tested specimen as rapidly as possible (within 10 minutes), in order to obtain an homogeneous immunological kinetics for antibodies binding. A too long delay between the distribution of the first and the last wells may induce an influence of immunological kinetics and produce wrong results.
- b) Avoid letting the plate in the bright sunlight during incubations and more particularly during colour development. A micro-ELISA plate shaker can be used. An incubation temperature of 18-25°C must be respected. Results are affected by a too high (>25°C) or too low (<18°C) temperature, and measured A450 are then too high or too low. It has to be considered when analyzing the results. In the same way, if a microplate shaker is used, it should be used only at the beginning of each step (sample introduction, immunoconjugate introduction, stop solution introduction), for 1 to 2 minutes, in order to obtain a good homogeneity. A450 values generated in the assay are significantly increased if shaking is used throughout the incubation steps.
- c) Never let the plates empty between the addition of the reagents or following the washing step. The next reagent must be added within 3 minutes, in order to prevent the plate from drying, which could damage the immobilized components. If necessary, keep the plate filled with Wash Solution and empty it just before the introduction of the next reagent. The washing instrument must be adjusted in order to wash the plates gently, and to avoid a too drastic emptying, which could lower plate reactivity.
- d) For addition of the TMB substrate, the time interval between each row must be accurate and exactly determined. It must be the same when stopping the reaction.
- e) For bichromatic readings, a reference wavelength at 690 nm or at 620 nm can be used.

QUALITY CONTROL:

- Controls provided in the kit allow validating the right performance of the assay.
- Expected A450 values for positive and negative controls can present variations from lot to lot but, when the assay is run at room temperature, between 18 and 25°C, they always are:

P = A450 for positive control ≥ 1.0

N = A450 for negative control: ≤ 0.25

Obtained values for P and N, at 20±1°C, are indicated on the flyer provided in the kit. Obtained A450 can vary according to the effective temperature during the assay run.

EXPRESSION OF RESULTS:

- Results are expressed according to the A450 values, as positive or negative.
- When higher dilutions are used, (i.e. D), the complementary dilution factor must be considered.

INTERPRETATION OF RESULTS:

When the assay is run at 20±1°C, the results are as follows:

Positive: A450 > 0.50
Weakly Positive: A450 > 0.30 to < 0.50
Negative: A450 ≤ 0.30

Note: When the room temperature is out of the recommended range, absorbance values can be affected. The positive control can then be used for adjusting the cut-off value. The flyer provided in the kit indicates the A450 value obtained for the positive control of the ZYMUTEST HIA lot used, and the value in % of this A450 corresponding to the cut-off. The adjusted cut-off value is then the corresponding % of the absorbance measured for the positive control in your series of measurements.

LIMITATIONS OF THE ASSAY:

If the washing step is not correctly performed, the negative control can produce a high absorbance value. In order to avoid non-specific colour development, check that the washing step is performed efficiently.

As for any autoantibody assay, clinical situation such as presence of inflammation, infectious diseases, auto-immune diseases, immun-complexes, can induce a high background, which can be within the grey zone or in the weak positive range. Check then for the possible presence of antibodies on another specimen collected later.

Erroneous results can occur from bacterial contamination of test materials, inadequate incubation periods, inadequate washing or decanting of test wells, exposure of substrate to stray light, omission of

test reagents, exposure to higher or lower than prescribed temperature requirements or omission of steps.

The results of this assay should not be used as the sole basis for a clinical decision.

Although a positive reaction obtained using this assay may indicate the presence of a heparin-associated antibody, the detection of such antibodies, however, DOES NOT CONFIRM the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia (HIT).

Some patients may have naturally occurring antibodies to PF4 or other chemokines.

PATHOLOGICAL VARIATIONS:

Heparin dependent antibodies are immunoglobulins present in plasma of patients with suspicion of Heparin-Induced Thrombocytopenia (HIT) type II.

Type II HIT, the immunoallergic type, occurs during heparin treatment [1-2] and remains a major complication of this therapy.

It is caused by the development of antibodies to Heparin-Protein (usually Platelet Factor 4) macromolecular complexes [3-4]. In addition to antibodies to PF4-Heparin, antibodies to other chemokines such as Neutrophil-Activating Peptide or NAP2 and Interleukin-8 or IL8 have also been evidenced in some patients [5].

Development of pathology is mainly associated with heparin-dependent antibodies of the IgG isotype. However, when the test is used for assessing the risk of developing a clinical complication of HIT, the assay of the global IgGAM isotypes is useful as a prognostic factor for this complication.

When HIT occurs first, inflammation and/or platelet activation mechanisms, associated with various medical or surgical contexts, develop and lead to an increased release of chemokines and then promote formation of heparin complexes with chemokines (usually PF4). These multimolecular complexes can become antigenic and induce the generation of heparin-dependent antibodies. Heterogeneity of these antibodies could partly explain some discrepancies between the clinical suspicion of HIT and biological tests [6].

Frequently, heparin dependent antibodies can be asymptomatic, especially when they are of the IgM isotype. The clinical association is higher with elevated antibody concentrations and with the IgG isotype.

RELATED ASSAYS:

The various isotypes can be measured globally, using the ZYMUTEST HIA IgGAM screening assay kit (# ARK040D), for assessments of the risk to develop HIT, in patients treated with heparins: presence of antibodies is a risk indicator for development of HIT.

COMPLEMENTARY CHARACTERIZATION OF POSITIVE SAMPLES (IF REQUIRED):

If required, positive samples can be further characterized by their binding inhibition in presence of heparin. For this confirmation, to 500µl of the 1:100 diluted tested specimen, add 10µl of a 100 IU/ml Unfractionated heparin solution and mix homogeneously. This heparinized solution (2 IU/ml final) must then be tested in the assay. Heparin dependent antibody binding to the plate is then inhibited (decrease in absorbance more than 50%) in almost all the cases. This inhibition confirms the heparin dependent binding of antibodies. In very rare specimen, already positive in the absence of platelet lysate, this inhibition is not observed, and the assay remains positive without or with heparin in the diluent: the result (which remains unclear from the present knowledge) must then be considered as inconclusive, and interpreted along with other assays or criteria for the diagnosis of HIT.

ASSAY SPECIFICITY AND CHARACTERISTICS:

This optimised assay is designed with biologically available and immobilized heparin, then stabilized and saturated, which allows reacting fully with heparin binding proteins and antibodies. This reliable method then provides high reproducibility, by identifying IgG isotype heparin-dependent antibodies, and by mimicking the binding mechanism of antibodies in vivo, on heparin present at the cell surface, especially on platelets or endothelial cells.

INTERFERENCE:

No interference of Heparin up to 1 IU/ml.

PERFORMANCE EVALUATION:

- External study: Zymutest IgG versus Serotonin Release Assay (SRA) for n=174 samples. Matches indicate that both were positive or both were negative.

Matches	131
% Matching	75.29

- Two site external study: Zymutest IgG versus Asserachrom for n=243 samples:

	Asserachrom	
	Positive	Negative
Zymutest IgG	33	17
	42	151
Agreement	76%	
Co-positivity	44%	
Co-negativity	90%	
Sample Size	243	

- Example of reproducibility data:

Sample:	Intra assay			Inter assay		
	N	A450	CV%	N	A450	CV%
IgG Positive control	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, Bridey 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, Bridey 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.



ZYMUTEST HIA IgG (# ARK040A)

Recherche des anticorps héparine dépendants d'isotype IgG par ELISA.



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement

Dernière version : 23/10/2007

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST HIA IgG est un test ELISA standardisé et optimisé pour la recherche et le dosage des anticorps héparine dépendants d'isotype IgG, utilisable sur plasma humain ou sérum, ou tout autre milieu biologique où ces anticorps doivent être mesurés.

PRINCIPE :

Le plasma ou le sérum dilué à tester est introduit dans l'un des puits de la plaque sensibilisée, en présence de lysat plaquettaire. Les anticorps héparine dépendants, de type IgG, quand ils sont présents, forment un complexe avec l'héparine non fractionnée, biologiquement disponible, immobilisée et saturée. Après lavage, les anticorps ainsi fixés sont révélés par l'immunoconjugué, constitué d'anticorps polyclonaux de chèvre spécifiques du fragment F_{cy} de l'IgG humaine, et couplés à la peroxydase (HRP). Cet immunoconjugué réagit spécifiquement avec les anticorps héparine dépendants de type IgG. Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H₂O₂), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps héparine dépendants de type IgG présente dans l'échantillon testé.

ECHANTILLONS :

- Plasma humain prélevé sur anticoagulant citraté ou Na₂ EDTA ou sérum humain.
- Tout autre liquide biologique où la recherche anticorps héparine dépendants de type IgG doit être effectuée.

REACTIFS :

- COAT :** Microplaque ELISA (Micro ELISA plate), contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par de l'héparine non fractionnée, biologiquement disponible, saturée, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
- SD :** 2 flacons de 50 ml de diluant échantillon pour les tests HIA (HIA Sample Diluent), pr l'emploi. Contient de l'azide de sodium.
- C₊ :** 3 flacons de contrôle positif lyophilisés (HIA IgG Positive control). A reconstituer par 1 ... de diluant échantillon, afin d'obtenir le contrôle positif prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100). La réactivité attendue (DO450) est indiquée sur le papillon fourni dans le coffret.
- C₋ :** 3 flacons de contrôle négatif (Negative control), lyophilisés, contenant du plasma humain normal dilué. Après reconstitution avec 1 ml de diluant échantillon, le contrôle négatif est prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100).
- CLY :** 3 flacons de lysat cellulaire, lyophilisés. A reconstituer par 2 ml d'eau distillée, afin d'obtenir le réactif prêt à l'emploi.
- IC :** 3 flacons d'immunoconjugué (Anti-IgG (F_{cy})-HRP immunoconjugué), anticorps polyclonaux de chèvre, spécifiques de la partie F_{cy} de l'IgG humaine, couplés à la peroxydase et lyophilisés. L'immunoconjugué prêt à l'emploi est obtenu après reconstitution par 7,5 ml de diluant pour immunoconjugué (CD).
- CD :** 1 flacon de 25 ml de diluant pour immunoconjugué (Conjugate Diluent), prêt à l'emploi.
- WS :** 1 flacon de 50 ml de solution de lavage (Wash Solution), 20 fois concentrée.
- TMB :** 1 flacon de 25 ml de substrat : 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB), contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
- SA :** 1 flacon de 6ml d'acide sulfurique 0.45M (Stop Solution) (SA), prêt à l'emploi.

Nota : Utiliser uniquement les réactifs provenant de coffrets d'un même lot. Ne pas mélanger les réactifs provenant de différents lots de kits pour réaliser un dosage.

MATERIEL NECESSAIRE ET NON FOURNI :

- Pipettes à 8 canaux permettant de distribuer des volumes de 50 à 300 µl
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 µl, de 20 à 200 µl et de 200 à 1000 µl
- Matériel de lavage pour microplaques (et agitateur).
- Lecteur de microplaques ELISA réglé à une longueur d'ondes de 450 nm.
- Eau distillée.

PREPARATION, CONSERVATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Dans leur emballage d'origine, avant toute utilisation et conservés à 2-8°C, les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret.

- Micro ELISA plate :** Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les barrettes sorties du sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 8 semaines dans leur emballage d'origine, hermétiquement fermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à 2-8°C, dans le sachet plastique minigrig fourni.
- HIA Sample Diluent :** Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 8 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.

Précautions : Le diluant échantillon pour test HIA contient de faibles quantités d'azide de sodium (NaN₃) qui peuvent générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.

- Contrôle positif HIA IgG :** Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "HIA-Sample-Diluent". Le contrôle positif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma contenant des anticorps héparine dépendants d'isotype IgG, déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant 2 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation, ou 2 mois congelé à -20°C ou moins.

- Negative Control :** Chaque flacon doit être reconstitué avec 1 ml de "HIA-Sample-Diluent". Le contrôle négatif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma négatif déjà dilué au 1/100. Après reconstitution, ce flacon peut être conservé à 2-8°C, pendant 2 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation, ou 2 mois congelé à -20°C ou moins.

- CLY :** Le flacon doit être reconstitué par 2 ml d'eau distillée. Le réactif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi. Après reconstitution, ce flacon peut-être conservé à 2-8°C pendant 2 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation, ou 2 mois congelé à -20°C ou moins.

Précautions : Le CLY utilisé pour le dosage est une fraction extraite de plaquettes fraîches humaines. Le contrôle négatif est également préparé à partir de plasmas humains. Ces derniers ont été testés par des méthodes enregistrées et sont certifiés exempts pour l'anticorps VIH, le Hbs Ag et l'anticorps VCH. Toutefois, aucune méthode ne permettant d'exclure totalement le risque d'agent pathogène, ces produits doivent être manipulés avec toutes les précautions requises pour l'utilisation de produits potentiellement infectés.

- Anti-IgG(F_{cy})-HRP immunoconjugué :** Chaque flacon d'immunoconjugué doit être reconstitué par 7.5 ml de "Conjugate Diluent" au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. L'immunoconjugué reconstitué est stable au moins 24 heures à la température du laboratoire et 4 semaines à 2-8°C, ou 2 mois congelé à -20°C ou moins.

- Conjugate Diluent :** Le réactif est prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 8 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.

- Wash Solution :** Incuber, si nécessaire, le flacon de solution de lavage dans un bain-marie à 37°C jusqu'à totale dissolution des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée. Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution. Après ouverture, le flacon est stable 8 semaines à 2-8°C, à l'abri de toute contamination. La solution de lavage diluée peut être utilisée jusqu'à 7 jours après préparation, lorsqu'elle est protégée de toute contamination. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG.

- Substrat TMB :** prêt à l'emploi. Après ouverture, il peut être conservé à 2-8°C, pendant 8 semaines, en prenant soin d'éviter toute contamination lors de l'utilisation.

- Solution d'arrêt :** Solution contenant 0.45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi.

Précaution : Même dilué à 0.45 M, l'acide sulfurique est caustique. Comme pour tout réactif chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précaution, en particulier en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Eviter tout contact avec la peau et les yeux.

Nota : Sortir le coffret du réfrigérateur, au moins 30 min avant le dosage, afin que les divers réactifs s'équilibrent à température du laboratoire. Conserver les réactifs inutilisés à 2-8°C.

Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante, sans aucun dommage.

Lorsque les réactifs sont utilisés et conservés de façon appropriée, en conformité avec le protocole et les précautions recommandés, le coffret peut être utilisé sur une période de 2 mois, et barrette par barrette, si nécessaire.

MODE OPERATOIRE :

Préparation de l'échantillon :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique 0.109 M (ou 0,129M) (1 volume) ; le plasma est obtenu après 20 minutes de centrifugation à 2500 g ; le plasma citraté doit être utilisé dans les 24 heures ou conservé congelé, à -20°C ou moins, pendant 6 mois maximum. Juste avant utilisation, décongeler le plasma pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C. Le plasma décongelé est stable pendant au moins 2 heures à température du laboratoire. L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur Na₂ EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes que celles préconisées pour le plasma citraté.

L'utilisation de sérum est possible pour la recherche des anticorps héparine dépendants.

Le sérum est alors préparé de manière habituelle pour les dosages de laboratoire. Décanter le sérum du caillot avant utilisation ou congélation. Les conditions de conservation sont identiques à celles du plasma.

Plasma ou échantillon à tester et contrôles :

Le plasma ou le sérum à tester sont analysés dilués au 1/100 dans le diluant échantillon (HIA Sample Diluent). En présence d'échantillons avec un taux attendu très élevé d'anticorps héparine dépendants, diluer au 1/200 ou au 1/400, etc.... Les résultats (DO450 correspondantes) doivent alors être multipliés par 2, ou 4, etc....

Les contrôles sont prêts à l'emploi et correspondent à des plasmas déjà dilués au 1/100.

D.750.01/ZY/040A



8580 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Réalisation du dosage :

Sortir la quantité nécessaire de barrettes de 8 puits du sachet aluminium et les placer dans le cadre fourni. Introduire les réactifs dans les puits des micro-barrettes ELISA et réaliser le dosage comme indiqué dans le tableau ci-après :

Réactif	Volume	Procédure
CLy	50µl	Introduire le CLy dans les puits de la microplaque ELISA (a)
Contrôle positif IgG ou contrôle négatif ou échantillons dilués au 1:100 ou diluant échantillon (blanc)	200 µl	Introduire immédiatement les dilutions: – Contrôle positif IgG ou – contrôle négatif ou – Echantillons dilués ou – Diluant échantillon dans les puits de la plaque.(a)
Incuber 60 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (b)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages. (c)
Immunoconjugué anti-IgG (Fcγ)-HRP, reconstitué par 7.5 ml de diluant pour immunoconjugué	200 µl	Immédiatement après le lavage, introduire l'immunoconjugué dans les puits.(c)
Incuber 60 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (b)		
Solution de lavage (diluée 20x en eau distillée avant utilisation)	300 µl	Effectuer une série de 5 lavages. (c)
Substrat TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Immédiatement, introduire cette solution dans les puits. <i>Nota</i> : la répartition du substrat, barrette par barrette, doit se faire très précisément. (c,d)
Laisser la coloration se développer pendant 5 minutes à température du laboratoire (18-25°C) (b)		
Acide sulfurique 0.45 M	50 µl	Arrêter la réaction en introduisant 0.45M d'acide sulfurique. Respecter le même temps de répartition, barrette par barrette, que celui utilisé pour le substrat. (c,d)
Attendre 10 minutes pour laisser stabiliser la coloration puis lire la DO obtenue à 450 nm. (e) Soustraire les blancs		

Remarques :

- Effectuer les dépôts de l'étalonnage, des contrôles et des tests, le plus rapidement possible (≤ 10 min), pour une cinétique homogène des divers dosages. Un délai trop important entre les premiers et derniers dépôts peut influencer la cinétique immunologique et fausser les résultats.
- Éviter de laisser la plaque en pleine lumière lors des incubations et plus particulièrement lors du développement de la coloration. L'utilisation d'un agitateur pour microplaques ELISA est possible. Bien respecter la température d'incubation (18-25°C). Si la température est trop forte ($>25^\circ\text{C}$) ou trop faible ($<18^\circ\text{C}$), les résultats sont affectés et les DO mesurées à 450 nm sont trop fortes ou trop faibles. En tenir compte pour l'analyse des résultats. De même, si un agitateur de plaques est utilisé, n'agiter qu'au début de chaque étape (dépôt échantillon, dépôt conjugué, solution d'arrêt), pendant 1 à 2 minutes, afin d'obtenir une bonne homogénéité. L'utilisation continue d'un agitateur augmente sensiblement les DO 450 obtenues dans le test.
- Ne jamais laisser les puits de la plaque ELISA vides entre l'addition des réactifs ou après les étapes de lavage, afin de préserver les protéines insolubilisées. Le réactif suivant doit être ajouté dans les trois minutes afin d'éviter l'assèchement de la plaque. Si nécessaire, garder les puits remplis de solution de lavage et les vider juste avant distribution du réactif suivant. Régler le laveur de manière à effectuer un lavage doux. Une vidange trop violente des puits, lors de l'aspiration, peut endommager le coating et réduire la réactivité.
- Lors de la distribution du substrat TMB, l'intervalle de temps entre chaque rangée doit être défini et respecté avec précision. Il doit être le même lors de l'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique.
- Pour une lecture bichromatique, le filtre 620 nm ou 690 nm peut être utilisé comme longueur d'onde de référence.

VALIDATION :

- Les contrôles fournis dans le coffret, permettent de valider la bonne réalisation du dosage.
- Les DO attendues pour le contrôle positif et le contrôle négatif peuvent varier de lot à lot mais, lorsque le dosage est réalisé à température du laboratoire, entre 18 et 25°C, ces DO sont toujours de :

$$P = DO_{450} \text{ pour } C+ \ 1/1 : \geq 1.0$$

$$N = DO_{450} \text{ pour Contrôle Négatif} : \leq 0.25$$

Les valeurs obtenues pour P et N, à $20 \pm 1^\circ\text{C}$, sont indiquées pour chaque lot de réactif dans le papillon inclus dans le coffret.

Les DO450 obtenues peuvent varier en fonction de la température réelle à laquelle est effectuée le dosage.

EXPRESSION DES RESULTATS :

- Les résultats sont exprimés à l'aide des DO 450 obtenues, en positifs ou négatifs.
- Pour des dilutions plus importantes, prendre en compte le facteur de dilution complémentaire appliqué.

INTERPRETATION DES RESULTATS :

Lorsque la réaction est réalisée à $20 \pm 1^\circ\text{C}$, les résultats suivants sont obtenus :

Positif :	DO > 0.50
Faiblement Positif :	DO de 0.30 à 0.50
Négatif :	DO \leq 0.30

Note: Lorsque la température ambiante n'est pas comprise dans l'intervalle de température recommandé, les valeurs d'absorbances obtenues peuvent être affectées. Le contrôle positif peut alors être utilisé pour ajuster la valeur seuil. Le papillon fourni dans le coffret indique la DO450 obtenue pour le contrôle positif du lot ZYMUTEST HIA utilisé, et la valeur en % de cette DO450nm correspondant à la valeur seuil. La valeur seuil ajustée est alors le pourcentage correspondant de la valeur de DO450 mesurée pour le contrôle positif dans la série réalisée.

LIMITES DE LA METHODE :

Un lavage insuffisant de la plaque peut se traduire par un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.

Comme pour toute recherche d'anticorps, la présence d'états inflammatoires ou infectieux, d'immuno-complexes circulants, de gammopathies, de pathologies auto-immunes, peut entraîner une réactivité aspécifique faible dans la zone douteuse ou faiblement positive. Il est alors recommandé de réaliser ultérieurement un nouveau dosage sur un nouveau prélèvement.

VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

Les anticorps héparine dépendants sont des immunoglobulines présentes dans le plasma des patients suspects de développer une thrombopénie induite par l'héparine (TIH) de type II. La TIH de type II, de nature immunoallergique, survient dans le cadre d'une héparinothérapie [1-2] et reste une complication majeure de ce traitement. Elle est due à l'apparition d'anticorps dirigés contre un complexe macromoléculaire Héparine-Protéine (généralement Facteur 4 Plaquettaire, ou PF4) [3-4]. Des anticorps dirigés contre d'autres chémokines comme le neutrophil-activating peptide ou NAP2 et l'interleukine-8 ou IL8 ont aussi été mis en évidence dans le plasma de certains patients.[5]

La pathologie semble associée aux anticorps héparine dépendants d'isotype IgG le plus souvent. Toutefois, lorsque le test est utilisé pour le dépistage du risque d'évoluer vers une TIH, le dosage des anticorps globaux IgGAM est particulièrement utile comme facteur de pronostic de cette complication. Lorsque la TIH apparaît dans un premier temps, des phénomènes inflammatoires et/ou d'activation plaquettaire relatifs aux différents contextes médicaux et chirurgicaux, se développent et augmentent la libération de chémokines, ce qui favorise la formation de complexes héparine-chémokines (généralement PF4). Ces complexes de grande taille sont antigéniques et induisent la synthèse d'anticorps héparine dépendants. La grande hétérogénéité de ces anticorps pourrait expliquer en partie certaines discordances existant entre la clinique indiscutable suggérant le diagnostic de TIH et les examens biologiques [6].

Les anticorps héparine dépendants peuvent être fréquemment asymptomatiques, en particulier lorsqu'ils sont d'isotype IgM. L'association clinique est plus forte avec des concentrations élevées d'anticorps, et avec l'isotype IgG.

APPLICATIONS :

- Suspicion clinique de TIH durant un traitement à l'héparine (nécrose de la peau, chute du taux plaquettaire $<100.10^9$ G/L ou diminution $>30\%$ entre deux numérations successives ; ...). D'autres causes possibles de thrombopénie devront être recherchées et exclues. En présence de thrombopénie, un test positif permet de confirmer le diagnostic.
- Les anticorps héparine dépendants d'isotype IgG sont mieux associés avec le diagnostic clinique de TIH. Le coffret ZYMUTEST HIA IgG (#ARK040A) offre ainsi une meilleure spécificité de la complication clinique de TIH, mais une sensibilité moindre puisque les cas associés uniquement aux isotypes IgM et/ou IgA ne sont pas détectés.

TESTS ASSOCIES :

Les divers isotypes peuvent être mesurés :

- Globalement, avec le coffret de screening ZYMUTEST HIA IgGAM (#ARK040D), pour l'évaluation du risque de développement d'une TIH, chez les patients sous héparine (Non fractionnée ou HBPM) : la présence d'anticorps est un indicateur de risque de développement de TIH.
- Ou spécifiquement, avec le coffret ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM (#ARK040E), qui permet un isotypage complet des anticorps héparine-dépendants. Ce coffret présente un intérêt particulier pour toute étude de recherche ou prospective sur le développement de TIH durant un traitement à l'héparine.

CONFIRMATION DES ECHANTILLONS POSITIFS (SI NECESSAIRE) :

Si nécessaire, les échantillons testés positifs peuvent être confirmés par l'inhibition de la fixation des anticorps en présence d'héparine. Pour cela, à 500µl de l'échantillon testé (plasma ou sérum) dilué au 1/100, ajouter 10µl d'une solution d'héparine non fractionnée à 100 UI/ml, et homogénéiser. Cette solution héparinée (2 UI/ml final) doit alors être testée avec le coffret. La fixation d'anticorps héparine-dépendants sur la plaque sensibilisée est alors fortement inhibée. Cette inhibition confirme la fixation héparine-dépendante des anticorps.

SPECIFICITE ET CARACTERISTIQUES DU TEST :

Ce dosage est réalisé en utilisant de l'héparine biologiquement disponible, immobilisée, saturée et stabilisée, permettant à l'héparine de rester totalement accessible sur le plan réactionnel. Cette approche permet d'obtenir un dosage offrant une meilleure reproductibilité, une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité par l'identification des anticorps héparine dépendants de type IgG, et de mieux mimer le mécanisme de fixation des anticorps in vivo, sur l'héparine présente à la surface des cellules, en particulier celle des plaquettes ou des cellules endothéliales.

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, Bridey F, Dreyfus M et al : Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin induced thrombocytopenia : Thromb haemost, 1992, 68 : 95-96
- Amiral J, Bridey 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).
- Elalami, 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.



ZYMUTEST HIA IgG

(Ref. ARK040A)

Ensayo cualitativo para la detección de anticuerpos dependientes de heparina del isotipo IgG mediante ELISA



Fabricado por: HYPHEN BioMed

Para uso exclusivo en diagnóstico *in vitro*.

Última revisión: 23/10/2007

USO PREVISTO:

El kit ZYMUTEST HIA IgG para ELISA es un ensayo cualitativo diseñado para la detección de los anticuerpos dependientes de heparina, del isotipo IgG, en plasma humano en laboratorios clínicos. Está destinado para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DEL ENSAYO:

La muestra de plasma analizado diluido se introduce en uno de los micropocillos de la placa recubierta y se complementa con un lisado de plaquetas. Cuando están presentes, los anticuerpos dependientes de heparina, del isotipo IgG, forman complejos en la heparina no fraccionada biológicamente disponible, inmovilizada y saturada. Después de una etapa de lavado, los anticuerpos unidos se revelan con el inmunoc conjugado, compuesto de conjugado de peroxidasa (HRP)-anticuerpos policlonales anti-IgG humana obtenidos en cabra (específicos de Fcy). Este inmunoc conjugado reacciona específicamente con isotipos IgG. Después de una nueva etapa de lavado, se añade el sustrato de peroxidasa, tetrametilbencidina (TMB) en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), y aparece un color azul. El color se vuelve amarillo cuando se detiene la reacción con ácido sulfúrico. El color que aparece es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos dependientes de heparina, del isotipo IgG, presentes en la muestra analizada.

MUESTRAS ANALIZADAS:

Plasma humano anticoagulado con citrato trisódico.

REACTIVOS:

- RECUBRIMIENTO (COAT):** microplaca de ELISA, con 12 tiras de 8 pocillos, recubierta con heparina no fraccionada, biológicamente disponible, saturada y luego estabilizada. La placa se suministra envasada en una bolsa de aluminio herméticamente sellada que contiene desecante.
- DM (SD):** 2 viales con 50 ml de diluyente de muestras para HIA, listo para usar. Contiene azida de sodio.
- C₊:** 3 viales de control positivo de HIA IgG, liofilizado. Una vez reconstituido con 1 ml de diluyente de muestras para HIA, se obtiene el control positivo listo para usar (ya diluido 1:100). La reactividad prevista se indica en el folleto suministrado con el kit.
- C₋:** 3 viales de control negativo, liofilizado (plasma humano normal diluido). Una vez reconstituido con 1 ml de diluyente de muestras para HIA, se obtiene el control negativo listo para usar (ya diluido 1:100).
- LC (Cly):** 3 viales de lisado celular, liofilizado. Una vez reconstituido con 2 ml de agua destilada, se obtiene la solución lista para usar.
- IC:** 3 viales de inmunoc conjugado (inmunoc conjugado de HRP-anticuerpos anti-IgG (Fcy)), anticuerpos de cabra específicos de IgG humana (Fcy) unidos a HRP, liofilizado. Una vez reconstituido con 7,5 ml de diluyente de conjugado (DC), se obtiene el inmunoc conjugado listo para usar.
- DC (CD):** 1 vial de 25 ml de diluyente de conjugado, listo para usar.
- SL (WS):** 1 vial de 50 ml de solución de lavado concentrada 1:20.
- TMB:** 1 vial de 25 ml de sustrato de peroxidasa: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina con peróxido de hidrógeno, listo para usar.
- AS (SA):** 1 vial de 6 ml de ácido sulfúrico 0,45 M (solución de parada), listo para usar. ☒

Nota: solo deben utilizarse componentes de un mismo número de lote de kits. No mezclar componentes de diferentes lotes para realizar el ensayo.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIOS NO SUMINISTRADOS:

- Pipeta de 8 canales o de repetición para dispensar 50-300 µl.
- Pipetas de 1 canal a volúmenes variables de 0 a 20 µl, de 20 a 200 µl y de 200 a 1.000 µl.
- Equipo de lavado (y agitador) para microplacas de ELISA.
- Lector de microplacas de ELISA con una longitud de onda establecida en 450 nm.
- Agua destilada.

PREPARACIÓN, ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS:

Los reactivos sin abrir, en el embalaje original, antes del uso y almacenados a 2-8 °C, son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la caja.

- Microplaca de ELISA:** abrir la bolsa de plástico y sacar la cantidad de tiras de 8 pocillos necesaria para la serie de pruebas. Una vez fuera de la bolsa, las tiras deben utilizarse en un plazo de 30 minutos. Las tiras no utilizadas pueden almacenarse a 2-8 °C durante 8 semanas en la bolsa de aluminio original, que debe contener desecante, estar herméticamente cerrada y protegida de la humedad, y almacenarse en la bolsa de almacenamiento de microplaca suministrada (Minigrip).
- Diluyente de muestras para HIA:** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante 8 semanas, almacenado a 2-8 °C, siempre que esté protegido de cualquier contaminación bacteriana. Este reactivo contiene azida de sodio.

Advertencia: el diluyente de muestras para HIA contiene azida de sodio, que puede reaccionar con el cobre y el plomo de las cañerías y formar azidas metálicas altamente explosivas. Dejar correr el agua abundantemente cuando se elimine el producto por un fregadero.

- Control positivo de HIA IgG:** reconstituir cada vial con 1 ml de diluyente de muestras para HIA para obtener el control positivo listo para usar. Corresponde a un plasma que contiene anticuerpos dependientes de heparina del isotipo IgG, ya diluido 1:100. Tras la reconstitución, el control positivo es estable durante 2 semanas a 2-8 °C, siempre que esté protegido de cualquier contaminación bacteriana, o durante 2 meses a una temperatura de -20 °C o inferior.
- Control negativo:** reconstituir cada vial con 1 ml de diluyente de muestras para HIA para obtener el control negativo listo para usar. Corresponde a un plasma humano normal, ya diluido 1:100. Tras la reconstitución, el control negativo es estable durante 2 semanas a 2-8 °C, siempre que esté protegido de cualquier contaminación bacteriana, o durante 2 meses a una temperatura de -20 °C o inferior.
- LC (Cly):** reconstituir cada vial con 2 ml de agua destilada para obtener el reactivo listo para usar. Tras la reconstitución, el reactivo es estable durante 2 semanas a 2-8 °C, siempre que esté protegido de cualquier contaminación bacteriana, o 2 meses a una temperatura de -20 °C o inferior.

Advertencia: el LC (Cly) utilizado para el ensayo se obtiene de concentrados de plaquetas humanas recientes. El control negativo también se prepara con plasma humano. Todo el plasma humano utilizado se ha analizado con métodos aprobados para la detección de anticuerpos anti-VIH y anti-VHC y de antígeno HBsAg, y ha dado negativo. Sin embargo, no existe ninguna prueba que pueda excluir por completo la presencia de agentes infecciosos. Cualquier producto de origen humano debe manipularse con todas las precauciones necesarias, como si fuera potencialmente infeccioso.

- Inmunoc conjugado de HRP-anticuerpos anti-IgG (Fcy):** cada vial debe reconstituirse con 7,5 ml de diluyente de conjugado. Dejar que el sedimento se disuelva por completo antes del uso, y agitar el vial suavemente para homogeneizar el contenido. El conjugado reconstituido es estable durante al menos 24 horas a temperatura ambiente o durante al menos 4 semanas a 2-8 °C, o 2 meses a una temperatura de -20 °C o inferior.
- Diluyente de conjugado:** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante 8 semanas, almacenado a 2-8 °C, siempre que esté protegido de cualquier contaminación bacteriana. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
- Solución de lavado:** incubar el vial durante 15-30 minutos en un baño María a 37 °C hasta la completa disolución de los sólidos, cuando están presentes. Agitar el vial y diluir la cantidad necesaria en proporción 1:20 en agua destilada (los 50 ml contenidos en el vial permiten preparar 1 litro de solución de lavado). La solución de lavado debe almacenarse a 2-8 °C en su vial original y utilizarse en las 8 semanas posteriores a su apertura. La solución de lavado diluida debe usarse antes de 7 días, si se protege de cualquier contaminación. Este reactivo contiene Kathon CG al 0,05%.
- Sustrato TMB:** está listo para usar. Una vez abierto, puede utilizarse durante 8 semanas, almacenado a 2-8 °C, siempre que esté protegido de cualquier contaminación bacteriana.
- Solución de parada:** está listo para usar. ☒

Precauciones: el ácido sulfúrico, aunque diluido a 0,45 M, es cáustico. Al igual que con cualquier sustancia química parecida, el ácido sulfúrico debe manipularse con sumo cuidado. Evitar cualquier contacto con la piel y los ojos. Llevar gafas y guantes de protección durante la manipulación.

Nota: dejar que el kit alcance la temperatura ambiente, al menos 30 minutos antes del uso. Almacenar los reactivos no utilizados a 2-8 °C.

Los estudios de estabilidad realizados a 30 °C muestran que los reactivos mantienen su rendimiento y pueden ser transportados a temperatura ambiente sin sufrir daños.

Si se utiliza y se conserva como es debido, de acuerdo con el protocolo y las precauciones recomendadas, el kit puede utilizarse durante un período de dos meses, e incluso tira a tira, si hace falta.

PROCEDIMIENTO:

Obtención de muestras:

El plasma debe recogerse en un recipiente con anticoagulante citrato 0,109 M (o 0,129 M) (en proporción 9:1); tras una centrifugación de 20 minutos a 2.500 g, se decanta el plasma sobrenadante; el plasma citratado debe analizarse en un plazo de 24 horas o almacenarse congelado a una temperatura de -20 °C o inferior durante un período de hasta 6 meses, y descongelarse durante 15 minutos a 37 °C justo antes del uso. La muestra descongelada debe analizarse antes de 2 horas.

Plasma, muestra o control analizado:

El plasma se analiza a una dilución 1:100 en el diluyente de muestras para HIA (DM). Cuando se prevén cantidades elevadas de anticuerpos dependientes de heparina, las muestras deben analizarse a diluciones 1:200 o 1:400, etc. A continuación, los resultados (absorbancia correspondiente) deben multiplicarse por 2 o 4, etc.

Los controles están listos para usar (ya diluidos 1:100).

Procedimiento de ensayo:

Extraer de la bolsa de aluminio el número de tiras necesarias para la serie de determinaciones que deben realizarse. A continuación, colocar las tiras en el soporte suministrado. Introducir los reactivos en los diferentes pocillos de la microplaca de ELISA y llevar a cabo las distintas etapas del ensayo según se indica en la tabla siguiente:

D.750.21/ZY/040A



6580 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com

Reactivo	Volumen	Procedimiento
LC (Cly)	50 µl	Introducir el LC (Cly) en los pocillos de la microplaca de ELISA (a).
Control positivo de IgG o control negativo o muestra diluida 1:100 o diluyente de muestras (blanco)	200 µl	Introducir: - Control positivo de IgG o - control negativo o - muestra diluida o - diluyente de muestras en los pocillos de la microplaca de ELISA (a).
Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Solución de lavado (diluida 1:20 en agua destilada)	300 µl	Realizar 5 lavados sucesivos utilizando el equipo de lavado (c).
Conjugado (IC) (inmunoconjugado de HRP- anticuerpos anti-IgG [Fcγ], reconstituido con 7,5 ml de diluyente de conjugado)	200 µl	Inmediatamente después del lavado, introducir el inmunoconjugado en los pocillos de la microplaca de ELISA (c).
Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Solución de lavado (diluida 1:20 en agua destilada)	300 µl	Realizar 5 lavados sucesivos utilizando el equipo de lavado (c).
Sustrato TMB/H ₂ O ₂	200 µl	Inmediatamente después del lavado, introducir el sustrato en los pocillos. Nota: la distribución del sustrato, fila a fila, debe ser precisa y a intervalos temporales exactos (c, d).
Dejar que aparezca el color durante 5 min exactos a temperatura ambiente (18-25 °C) (b).		
Ácido sulfúrico 0,45 M	50 µl	Siguiendo exactamente los mismos intervalos de tiempo que para la adición de sustrato, detener la formación de color añadiendo el ácido sulfúrico 0,45 M (c, d).
Esperar durante 10 minutos para permitir que el color se establezca y medir la absorbancia a 450 nm (A450) (e). Restar el valor del blanco.		

Nota:

- Distribuir los controles y la muestra analizada lo más rápido posible (en 10 minutos) con el fin de obtener una cinética inmunológica homogénea en la unión de anticuerpos. Una demora demasiado larga entre la distribución de los primeros y los últimos pocillos puede dar lugar a una influencia de la cinética inmunológica y producir resultados erróneos.
- Evitar exponer la placa a la luz solar directa durante las incubaciones, y especialmente durante la aparición del color. Puede utilizarse un agitador para microplacas de ELISA. Debe respetarse una temperatura de incubación de 18-25 °C. Los resultados se ven afectados por una temperatura demasiado alta (> 25 °C) o demasiado baja (< 18 °C), por lo que los valores A450 medidos son entonces demasiado altos o demasiado bajos. Esto debe tenerse en cuenta a la hora de analizar los resultados. Del mismo modo, si se utiliza un agitador para microplacas, solo debería hacerse al principio de cada etapa (introducción de la muestra, introducción del inmunoconjugado, introducción de la solución de parada), durante 1 o 2 minutos, a fin de obtener una buena homogeneidad. Los valores A450 generados en el ensayo son significativamente mayores si se emplea el agitador en las etapas de incubación.
- No dejar nunca las placas vacías entre la adición de los reactivos o después de la etapa de lavado. El siguiente reactivo debe añadirse antes de 3 minutos para evitar que la placa se seque, lo que podría dañar los componentes inmovilizados. En caso necesario, llenar la placa con solución de lavado y vaciarla justo antes de introducir el siguiente reactivo. El equipo de lavado debe ajustarse para proporcionar un lavado suave de las placas y evitar un vaciado demasiado brusco, lo que podría disminuir la reactividad de la placa.
- Para la adición del sustrato TMB, el intervalo de tiempo entre cada fila debe ser preciso y determinarse con exactitud. Debe procederse del mismo modo al parar la reacción.
- En caso de lecturas biométricas, puede utilizarse una longitud de onda de referencia a 690 nm o a 620 nm.

CONTROL DE CALIDAD:

- Los controles suministrados con el kit permiten validar el correcto funcionamiento del ensayo.
- Los valores A450 previstos para controles positivos y negativos pueden presentar variaciones entre lotes, pero cuando se realiza el ensayo a temperatura ambiente, entre 18 y 25 °C, siempre son:

$$P = A450 \text{ para control positivo: } \geq 1,0 \quad N = A450 \text{ para control negativo: } \leq 0,25$$

Los valores obtenidos para P y N, a 20 ± 1 °C, se indican en el folleto suministrado con el kit. El valor A450 obtenido puede variar en función de la temperatura efectiva durante el ciclo de ensayo.

EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Los resultados se expresan de acuerdo con los valores A450, como positivos o negativos.
- Cuando se utilizan diluciones más altas (es decir, D), debe considerarse el factor de dilución complementario.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Cuando el ensayo se realiza a 20 ± 1 °C, los resultados son los siguientes:

Positivo:	A450 > 0,50
Débilmente positivo:	A450 > 0,30 y < 0,50
Negativo:	A450 ≤ 0,30

Nota: cuando la temperatura ambiente está fuera del intervalo recomendado, los valores de absorbancia pueden verse afectados. En tal caso, puede utilizarse el control positivo para ajustar el valor de corte. En el folleto suministrado con el kit se indica el valor A450 obtenido para el control positivo del lote de ZYMUTEST HIA utilizado, y el valor porcentual de A450 correspondiente al valor de corte. El valor de corte ajustado es, por lo tanto, el porcentaje correspondiente de la absorbancia medida para el control positivo en su serie de mediciones.

LIMITACIONES DEL ENSAYO:

Si la etapa de lavado no se realiza correctamente, el control negativo puede dar un valor alto de absorbancia. Para evitar la aparición de color inespecífico, comprobar que la etapa de lavado se realiza con eficacia.

Por lo que respecta al ensayo de autoanticuerpos, una situación clínica como la presencia de inflamación, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, inmunocomplejos, etc., puede dar lugar a un ruido de fondo elevado, que puede situarse dentro de la zona gris o en el intervalo débilmente positivo. En tal caso, comprobar la posible presencia de anticuerpos en otra muestra obtenida más adelante.

Pueden obtenerse resultados erróneos como consecuencia de contaminación bacteriana de los materiales de prueba, períodos de incubación insuficientes, lavado o decantación deficientes de los

pocillos de ensayo, exposición de sustrato a luz dispersa, omisión de reactivos de la prueba, exposición a una temperatura superior o inferior a los requisitos establecidos u omisión de etapas.

Los resultados de este ensayo no deben utilizarse como única base para una decisión clínica.

A pesar de que una reacción positiva obtenida mediante este ensayo puede indicar la presencia de un anticuerpo asociado a la heparina, la detección de dichos anticuerpos NO CONFIRMA definitivamente el diagnóstico de trombocitopenia inducida por heparina. Debe analizarse en asociación con la clínica. Algunos pacientes pueden presentar anticuerpos naturales frente a PF4 u otras quimiocinas.

VARIACIONES PATOLÓGICAS:

Los anticuerpos dependientes de heparina son inmunoglobulinas presentes en el plasma de pacientes con sospecha de trombocitopenia inducida por heparina de tipo II.

La trombocitopenia inducida por heparina de tipo II, el tipo inmunológico, se produce durante el tratamiento con heparina [1-2] y sigue siendo una complicación importante de este tratamiento.

Está causada por la aparición de anticuerpos frente a complejos macromoleculares [3-4] de heparina-proteína (normalmente factor plaquetario 4). Además de los anticuerpos frente a heparina-PF4, en algunos pacientes también se han detectado anticuerpos frente a otras quimiocinas, como el péptido activador de neutrófilos (NAP2) y la interleucina 8 (IL8) [5].

La aparición de la enfermedad está sobre todo asociada a anticuerpos dependientes de heparina del isotipo IgG.

Sin embargo, cuando la prueba se utiliza para evaluar el riesgo de padecer una complicación clínica de trombocitopenia inducida por heparina, el ensayo de los isotipos IgGAM globales es útil como factor pronóstico para esta complicación.

La primera vez que se produce una trombocitopenia inducida por heparina se ponen en marcha mecanismos de inflamación y/o activación plaquetaria, asociados a diversos contextos médicos o quirúrgicos, lo que conduce a una mayor liberación de quimiocinas y, como consecuencia, favorece la formación de complejos de heparina con quimiocinas (normalmente PF4). Estos complejos multimoleculares pueden volverse antigénicos y provocar la generación de anticuerpos dependientes de heparina. La heterogeneidad de estos anticuerpos podría explicar en parte algunas discrepancias entre la sospecha clínica de trombocitopenia inducida por heparina y las pruebas biológicas [6].

Con frecuencia, los anticuerpos dependientes de heparina pueden ser asintomáticos, en concreto cuando pertenecen al isotipo IgM. La asociación clínica es más alta con concentraciones de anticuerpos elevadas y con el isotipo IgG.

ENSAYOS RELACIONADOS:

Los diversos isotipos pueden medirse globalmente utilizando el kit de ensayo de detección ZYMUTEST HIA IgGAM (Ref. ARK040D), para evaluaciones del riesgo de padecer trombocitopenia inducida por heparina, en pacientes tratados con heparinas: la presencia de anticuerpos es un indicador de riesgo de aparición de la trombocitopenia inducida por heparina.

CARACTERIZACIÓN COMPLEMENTARIA DE MUESTRAS POSITIVAS (SI SE REQUIERE):

Si se requiere, las muestras positivas pueden caracterizarse aún más en función de su inhibición de la unión en presencia de heparina. Para esta confirmación, añadir 10 µl de una solución de heparina no fraccionada de 100 UI/ml a 500 µl de la muestra analizada diluida 1:100 y mezclar de forma homogénea. A continuación, la solución heparinizada (2 UI/ml final) debe analizarse en el ensayo. Entonces se inhibe la unión del anticuerpo dependiente de heparina a la placa (disminución de la absorbancia superior al 50%) en casi todos los casos. Esta inhibición confirma la unión dependiente de heparina de anticuerpos. En muestras muy infrecuentes, ya positivas en ausencia del lisado plaquetario, no se observa esta inhibición, y el ensayo sigue dando positivo con o sin heparina en el diluyente: el resultado (que sigue siendo ambiguo según los conocimientos actuales) debe considerarse no concluyente e interpretarse junto con otros ensayos o criterios para el diagnóstico de la trombocitopenia inducida por heparina.

ESPECIFICIDAD DEL ENSAYO Y CARACTERÍSTICAS:

Este ensayo optimizado está diseñado con heparina inmovilizada y biológicamente disponible, luego estabilizada y saturada, lo que permite una reacción completa con proteínas y anticuerpos de unión a la heparina. Este método fiable proporciona, por consiguiente, una alta reproducibilidad, al identificar anticuerpos dependientes de heparina del isotipo IgG, e imitar el mecanismo de unión de los anticuerpos *in vivo*, en la heparina presente en la superficie celular, especialmente en las plaquetas o en las células endoteliales.

INTERFERENCIA:

Sin interferencia de la heparina hasta 1 UI/ml.

EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO:

- Estudio externo: Zymutest IgG frente a Serotonin Release Assay (SRA) para n = 174 muestras. Las coincidencias indican que ambos fueron positivos o negativos.

Coincidencias	131
% de coincidencia	75,29

- Estudio externo de doble anticuerpo: Zymutest IgG frente a Asserachrom para n = 243 muestras:

Zymutest IgG	Asserachrom	
	Positivo	Negativo
Positivo	33	17
Negativo	42	151
Concordancia	76%	
Copositividad	44%	
Conegatividad	90%	
Tamaño muestral	243	

- Ejemplo de datos de reproducibilidad:

Muestra:	Intraensayo			Interensayo		
	N	A450	CV%	N	A450	CV%
Control positivo de IgG	6	1,31	3,07	7	1,34	7,11

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Gruel Y. Thrombopenie 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'heparine. 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.

D.750.21/ZY/040A



6560 Gove Court • Mason, OH 45040

Phone: 513.770.1991

Toll Free: 866.783.3797

Fax: 513.573.9241

Email: info@aniara.com

www.aniara.com