



ZYMUTEST HIA IgM (# ARK040B)

Assay of heparin-dependent antibodies of the IgM isotype
by ELISA



Manufactured By: HYPHEN BioMed

For in vitro diagnostic use only

Last revision : 23/10/2007

INTENDED USE:

The ZYMUTEST HIA, IgM ELISA kit, is a standardised and optimised enzyme immuno-assay designed for measuring heparin-dependent antibodies of the IgM isotype, in human plasma or serum, or in any biological fluid where these antibodies must be measured.

ASSAY PRINCIPLE:

The diluted assayed plasma sample or biological fluid is introduced into one of the microwells of the coated plate, and supplemented with a platelet lysate. When present, heparin-dependent antibodies, of the IgM 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 IgM (μ specific)-peroxidase (HRP) conjugate. This immunoconjugate reacts specifically with IgM isotypes. Following a new washing step, the peroxidase substrate, Tetramethylbenzidine (TMB) in presence of hydrogen peroxide (H_2O_2), 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 IgM isotype, present in the tested sample.

TESTED SAMPLES:

- Trisodium citrate or Na_2 EDTA anticoagulated human plasma or human serum.
- Any biological fluid, where human heparin-dependent antibodies, of the IgM isotype, must be assayed.

REAGENTS:

1. **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.
2. **SD:** 2 vials containing 50 ml of HIA Sample Diluent, ready to use. Contains Sodium Azide
3. **C+:** 3 vials of HIA IgM 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.
4. **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).
5. **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.
6. **IC:** 3 vials of immunoconjugate (Anti-IgM (μ)-HRP immunoconjugate), goat antibodies specific for human IgM (μ) - coupled to HRP, lyophilised. When restored with 7.5 ml of Conjugate Diluent (CD), the ready to use immunoconjugate is obtained.
7. **CD:** 1 vial of 25 ml of conjugate diluent, ready to use.
8. **WS:** 1 vial of 50 ml of 20 fold concentrated Wash Solution.
9. **TMB:** 1 vial of 25 ml peroxidase substrate: 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidine containing hydrogen peroxide, ready to use.
10. **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 μ l.
- 1-channel pipettes at variable volumes from 0 to 20 μ l, 20 to 200 μ l and 200 to 1000 μ l.
- 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.

1. **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 (minigrip).

2. **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.

3. **HIA IgM 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 IgM 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.
4. **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.
5. **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.

6. **Anti-IgM (μ)-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.
7. **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.
8. **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.
9. **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.
10. **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. EDTA collected human plasma may also be used. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

Heparin-dependent antibodies can also be assayed on serum. Serum is then prepared according to the usual conditions for laboratory testing. Serum must be decanted from the clot before being used or stored frozen. Conditions of storage are the same than those for citrated plasma.

Tested plasma or sample or control:

Plasma or serum 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).

D.750.02/ZY/040B



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

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:

Reagent	Volume	Procedure
CLy	50µl	Introduce the CLy into the micro ELISA plate wells (a)
IgM Positive control or Negative control or 1:100 diluted sample or sample diluent (blank)	200 µl	Introduce the : – IgM 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-IgM (µ)-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. Nota: 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:

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

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 IgG/IgM 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.

APPLICATIONS:

Measurement of human heparin-dependent antibodies of the IgM isotype, in research or prospective studies on development of HIT during heparin therapy.

RELATED ASSAYS:

- The ZYMUTEST HIA IgGAM Kit (#ARK040D), is a global screening assay that measures globally human heparin-dependent antibodies of the IgG, IgM or IgA isotypes, for the following applications:
 - Assessment of the risk to develop HIT, in patients treated with heparins (Unfractionated or LMWH): presence of antibodies is a risk indicator for development of HIT.
 - Clinical suspicion of HIT during heparin therapy (skin necrosis; drop of platelet count to <100.10⁹ G/L or decrease > 30% on two successive counts...). Other possible causes of thrombocytopenia should be investigated and ruled out. In presence of thrombocytopenia, a positive test allows confirming the diagnosis.
- Heparin-dependent antibodies of the IgG isotype are better associated with the clinical diagnosis of HIT. The ZYMUTEST HIA IgG assay (#ARK040A) offers then a better specificity for the clinical complication of HIT, but it has less sensitivity as cases associated with only IgM and/or IgA isotypes are missed.
- The various isotypes can also be specifically measured with the ZYMUTEST HIA IgG, IgM, IgA kit (#ARK040E), which allows a full isotyping of heparin dependent antibodies. This assay is of special relevance for all research or prospective studies on development of HIT during heparin therapy.

CONFIRMATION OF POSITIVE SAMPLES (IF REQUIRED):

If required, positive samples can be confirmed by their binding inhibition in presence of heparin. For this confirmation, to 500µl of the 1:100 diluted tested specimen (plasma or serum) 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 highly inhibited. This inhibition confirms the heparin dependent binding of antibodies.

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, high sensitivity and high specificity, by identifying IgM 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.

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).
- 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.

D.750.02/ZY/040B



ZYMUTEST HIA IgM (# ARK040B)

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



Fabricant: HYPHEN BioMed

Utilisation *in vitro* exclusivement

Dernière version : 23/10/2007

MÉTHODE :

La trousse ZYMUTEST HIA IgM est un test ELISA standardisé et optimisé pour la recherche et le dosage des anticorps héparine dépendants d'isotype IgM, 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 IgM, 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 μ de l'IgM humaine, et couplés à la peroxydase (HRP). Cet immunoconjugué réagit spécifiquement avec les anticorps héparine dépendants de type IgM. 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 IgM 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 IgM 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), prêt à l'emploi. Contient de l'azide de sodium.
- C₊ :** 3 flacons de contrôle positif lyophilisés (HIA IgM Positive control). A reconstituer par 1 ml 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-IgM (μ)-HRP immunoconjugué), anticorps polyclonaux de chèvre, spécifiques de la partie μ de l'IgM 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 μ l
- Pipettes à volume variable de 0 à 20 μ l, de 20 à 200 μ l et de 200 à 1000 μ l
- 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 minigrip 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 composés explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre. Pour éviter ce risque, effectuer des lavages intensifs.

- Contrôle positif HIA IgM :** 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 IgM, 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-IgM(μ)-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/040B



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 IgM ou contrôle négatif ou échantillons dilués au 1:100 ou diluant échantillon (blanc)	200 µl	Introduire immédiatement les dilutions: – Contrôle positif IgM 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-IgM (µ)-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 > 0.30 et <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 favorable à une 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 :

Mesure des anticorps héparine-dépendants d'isotype IgM, pour toute étude de recherche ou prospective sur le développement de TIH durant un traitement à l'héparine.

TESTS ASSOCIES :

- Le coffret ZYMUTEST HIA IgGAM (#ARK040D) est un test de **screening** qui détecte globalement les anticorps héparine-dépendants d'isotypes IgG, IgA ou IgM, pour les applications suivantes :
- 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.
- 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.
- Les divers isotypes peuvent également être mesurés 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 U/ml, et homogénéiser. Cette solution héparinée (2 U/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 IgM, 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 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).
- 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.

D.750.01/ZY/040B