



HITAlert™ Kit

REF¹ IQP-396 ▽ 30 tests **i** package insert

IVD **CE** *In Vitro Diagnostic medical device*

INTERNATIONAL PACKAGE INSERT ENGLISH – DEUTSCH – FRANÇAIS – ITALIANO – ČESKY

English	3
Français	9
Deutsch	15
Italiano	21
Česky	27

This product is registered as “in vitro diagnostic use” in the countries that belong to the European Community. In all other countries it should be labeled “for research use only”.

This product is protected by US patent 5,763,201. IQ Products is exclusive licensee of this patent.

©2019 - IQ Products bv. All rights reserved. No parts of these works may be reproduced in any form without permission in writing.

HITAlert™ Kit

 REF⁷ IQP-396  30 tests  package insert

  **In Vitro Diagnostic medical device**

This product is protected by US patent 5,763,201. IQ Products is exclusive licensee of this patent.

Intended use

The HITAlert™ Kit is used for the detection of heparin complex specific antibodies, which are capable of activation of thrombocytes (platelets) and may lead to the development of immune heparin induced thrombocytopenia.

Principle of the test

Immune heparin induced thrombocytopenia (HIT) is a distinct syndrome in which laboratory detection of the pathogenic HIT antibodies is diagnostically useful. This platelet activation assay, which detects antibodies based on their characteristic platelet-activating properties, is different from the antigen assays, which measures antibodies reactive to platelet factor 4 (PF4) – heparin complexes or PF4 – polyanion complexes. Part of the pathogenic antibodies can be specific for heparin complexes based on heparin and interleukin-8 or heparin and neutrophil-activating peptide 2 though. The HITAlert™ Kit shows antibodies that recognize heparin complexes independent of the second molecule *and* it only shows those antibodies capable of inducing activation of the platelets. The antibodies that bind to the complex are able to bind to the FcγII receptor on the platelet and activate the platelet.

For the HITAlert™ Kit donor platelets (PRP) are used, which are incubated in the presence of patient serum and in the presence or absence of heparin. When pathogenic antibodies are present the activation of the donor platelets is shown using a platelet activation marker. By incubating the samples with an antibody against platelets and the activation marker this reaction can be visualized using flow cytometry. For the evaluation of the stained sample a standard flow cytometer, capable of detecting FITC (FL-1) and R-PE (FL-2) fluorescence, and software are necessary.

This HITAlert™ Kit should be used as a screening test. The results should always be used in conjunction with clinical findings or other serological tests.

For each suspected HIT patient a set of assay samples is tested:

- I. A sample of donor PRP with heparin; to show background activation due to handling and to exclude that the PRP donor is HIT positive.
- II. A sample of PRP with Ca-ionophore; to have activated thrombocytes, that can be used to set the flow cytometer.
- III. A sample of donor PRP with patient serum; to show 'background' activation due to the serum.
- IV. A sample of donor PRP with patient serum *and* a physiological concentration of heparin; to show activation due to the presence of heparin complex binding antibodies.
- V. A sample of donor PRP with patient serum *and excess* of heparin; this sample should show a decrease in platelet activation in case of a positive sample IV, since immune complexes are disrupted due to the high concentration of heparin.

It is advised always to include a sample of a known HIT II positive patient (material NOT supplied).

HITAlert™ Kit content

Reagent A	Assay buffer	5 ml
Reagent B	Heparin	150 µl
Reagent C	Platelet Activator (Ca-Ionophore)	1 vial
Reagent D	Staining buffer	20 ml
Reagent E	Platelet marker (Monoclonal antibody)	200 µl
Reagent F	Platelet Activation marker (Recombinant Protein)	200 µl
Reagent G	Heparin 1000 U/ml	150 µl
2.2 ml PP vials used for the sample incubation		30

Each kit contains sufficient reagents to test 6 patients (30 tests).

Laboratory material required but not included

- Flow cytometer
- citrate blood collection tube, for instance Greiner Vacuette 454382
- Tubes fitting the flow cytometer
- 70% or 96% ethanol
- Shaker (for instance ELISA plate shaker or platelet agitator)
- Laboratory centrifuge
- Adjustable micropipettes and tips

Storage

Upon receipt, store kit at 2 to 8 °C. Avoid direct sunlight. Reagents stored according to stated storage instructions are stable until the expiration date indicated on the label. For repeatedly testing store the reagents immediately after usage at 2 to 8 °C and the dissolved reagent C at -20 °C.

Warning and precautions

Reagents containing sodium azide may react with lead or copper plumbing to form explosive metal azides. On disposal, flush with large amounts of water to prevent azide build-up. All reagents should be handled in accordance with good laboratory practices using appropriate precautions. In addition, handle all patient samples with appropriate precautions. Do not pipette by mouth and wear gloves during the procedure.

Substitution of components other than those provided in this kit may lead to inconsistent or erroneous result. The test must be performed by well-trained and authorized laboratory technicians. Please contact the manufacturer when the original kit is damaged.

Instrument Requirements

- Make sure that the flow cytometer is calibrated correctly according to manufacturer's instruction.
- It is advised to perform instrument calibration and maintenance on regular basis.
- The flow cytometer should be operated by a technician skilled in the art. Evaluation of the results should be done by someone skilled in the interpretation of flow cytometric data.

Specimen Collection and Preparation

Platelet rich plasma (PRP)

Not all platelet donors have platelets suitable to make PRP to use for functional assays. PRP from several different donors should be tested with a patient sample known positive for HIT. The donor most suitable will give the highest activation in sample IV (patient sample with physiological concentration of heparin). It also important to screen the same platelet donors with a sample from individuals known to be negative for HIT.

It is important that the platelet donor did not use platelet inhibitors, like aspirin, or anti-inflammatory drugs, like Ibuprofen, Advil, etc. during the last 3 to 4 days prior to the blood draw. These agents can cause failure of the assay, although reagent C may still work well.

Preparation of platelet rich plasma (PRP)

- Collect venous blood of a 0 blood type donor into a Citrate Solution Evacuated Tube (for instance: 454382, Greiner Vacuette), using aseptic venapuncture.
- Mix the blood with the citrate once by gently inverting the tube. *Prevent unnecessary agitation.*
- The blood sample should be stored at room temperature (20 to 25 °C) and processed directly after drawing.
- Spin the blood 5 minutes at 100g with low acceleration and brake off.
- Remove the cap and collect the upper yellow fluid, this is the PRP, into an empty tube. Stay well above the red and white cell pellet! WBC and RBC are inconvenient in the test.
- Use the PRP within 2 hours.

Processing of a fresh patient sample

- Collect venous blood from the patient into a no additive (serum) tube (for instance 454045, Greiner Vacuette), using aseptic venapuncture.
- To collect the serum, allow 30 minutes for clot forming and spin the tube 20 minutes at 1000g at RT.
- Remove the cap and collect the upper yellow fluid (serum) into an empty tube. *Stay well above the red and white cell pellet and away from the clot.*
- The serum sample should be stored at room temperature (20 to 25 °C) until processing.
- Process serum sample within 12 hours after collection. Serum can be stored for a longer period at -80 °C.

Processing of a frozen patient sample

- Frozen patient serum can also be used, for instance when the sample should be tested on a different location. It is advised to use serum that has only been frozen once.
- Store the samples on ice after thawing.
- Centrifuge the samples before use at high speed (20 minutes at 1000 g) to remove aggregates or filter them through a 0.2 µm centrifugal filter (for instance VWR 516-0233).

Test Procedure HITA/ert™ Kit

Do *not* use pre-warmed or heated (heat inactivated) patient serum.

1. Dissolve reagent C in 200 µl 70% or 96% ethanol. This is the reagent C stock solution.
2. Mix the reagent C stock solution well by vortexing or end over end mixing.
3. Reagent C needs 15 to 30 minutes to dissolve completely in ethanol. The dissolved material might show a little precipitation.
4. This reagent C stock solution can be used directly for the assay. Mark the vial properly and store the reagent C stock solution after use at -20 °C, so it can be used for the next assays from the same kit too.

Sample incubation

5. It is important that the steps are executed in the right order and with care. Abrupt agitation will decrease the reliability of the assay.
6. Perform the first incubation step (table 1) in the 2.2 ml vials included in the kit.
7. Perform the assay by adding together the reagents from left to right on the bottom of a 2 ml vial (*Make sure you use a new tip with every pipetting step*):

Assay Samples	Reagent A	PRP	Patient Sample	Reagent B	Reagent G	Reagent C
I	35 µl	10 µl	---	5 µl	---	---
II	35 µl	10 µl	---	---	---	5 µl
III	30 µl	10 µl	10 µl	---	---	---
IV	25 µl	10 µl	10 µl	5 µl	---	---
V	25 µl	10 µl	10 µl	---	5 µl	---

Table 1. Components to add together for sample incubation.

- I: PRP with heparin
- II: PRP with calcium ionophore
- III: PRP with patient sample
- IV: PRP with patient sample and heparin
- V: PRP with patient sample and 100 U/ml heparin

8. Mix the suspension carefully by pipetting up and down. *Avoid generating air bubbles.*
9. Incubate the tubes at room temperature (20 to 25 °C) on a horizontal orbital shaker for one hour. The speed of the shaker must be fast enough to get a slight movement of the samples. *Avoid the generation of air bubbles.*

Staining of the samples

10. Prepare 5 tubes (suitable for flow cytometry) by labeling them with I, II, III, IV and V.
11. Make in a new tube a mixture of 210 µl reagent D, 30 µl reagent E and 30 µl reagent F and mix well.
12. Add 45 µl of this mixture to each of the tubes from step 10. Store the tubes in the dark until part of the incubated assay sample can be added.
13. After the one hour incubation (step 9) add 5 µl of the assay sample mixture to the corresponding tube with staining solution. Mix the samples by carefully pipetting up and down. *Avoid generation of air bubbles.* Incubate the mixture 15 minutes in the dark at room temperature (20 to 25 °C).
14. Add 400 µl reagent D to the tube.
15. The cells are now ready for acquisition and evaluation by flow cytometry. Please run acquisition as soon as possible and no later than 30 minutes after addition of reagent D.

Data collection

Adjustment of flow cytometer

For adjustment of the flow cytometer settings three tubes are used (table 2):

- Label three tubes (suitable for the cytometer) with S1, S2 and S3.
- Add the different components to the tubes following table 2. Make sure to add 5 µl assay sample II in each tube.
- Mix the tubes carefully by pipetting up and down avoid generating of air bubbles. Incubate 15 minutes in the dark at RT.
- Add 400 µl reagent D to each tube.

• Cells are now ready to use for set up of the flow cytometer.

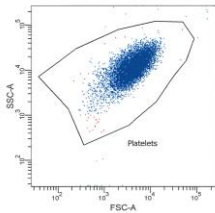
Tube	Samples (5 µl)	Reagent D	Reagent E	Reagent F
S1	II	45 µl	---	---
S2	II	40 µl	5 µl	---
S3	II	40 µl	---	5 µl

Table 2. Components to add together for adjustment of the settings of the flow cytometer. Platelets are used from assay sample II (step 4).

Analysis

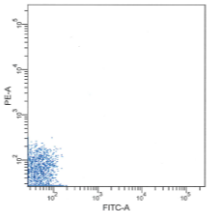
1. Make three dot plots, a Forward scatter (FSC) vs. Sideward Scatter (SSC) dot plot with logarithmic scale to select the platelets, a R-PE vs. SSC dot plot to select the platelet marker positive events and a FITC vs. R-PE dot plot to determine the activation of the platelets.
2. Adjust the voltage settings for the FSC-SSC by use of tube S1.

Select all platelets by using a region and exclude debris and background noise by setting the appropriate FSC threshold (see Cytogram 1). Do not make the gate too tight on the lower left hand side. After activation of the platelets part of the platelets will get smaller (microvesicles). This gate can be checked by using backgating of the activation marker and platelets marker positive cells from step 5. Activate the region for the next step in the evaluation.



Cytogram 1. SSC (vertical) / FSC (horizontal) dot plot and region to select the platelets.

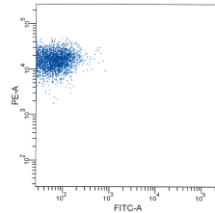
Sample S1 is also used to adjust the FL-1 and FL-2 photomultiplier tube (PMT) voltages. Make a FL-1/FL-2 dot plot and set the FL-1/FL-2 baseline signals in the lower left corner in an FL-1 vs. FL-2 dot plot (see Cytogram 2).



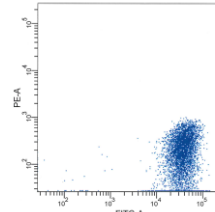
Cytogram 2. Correct adjustment of the PMT voltages for FL-2 (vertical) and FL-1 (horizontal) of the unstained sample.

3. Sample S2 and S3 are used for adjusting the compensation. These compensation settings between FITC (FL-1) and R-PE (FL-2) fluorescence signals should be optimized to separate the stimulated (FL-1 positive) from the unstimulated (FL-1 negative) platelets correctly.
 - a. use sample S2 to adjust the compensation of R-PE (FL-2) from the FITC (FL-1) channel (see Cytogram 3).

b. use sample S3 to adjust the compensation of FITC (FL-1) from the R-PE (FL-2) channel (see Cytogram 4).



Cytogram 3. Compensation of R-PE (FL-2, vertical) signal from the FL-1 (horizontal) channel.

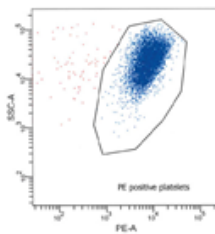


Cytogram 4. Compensation of FITC (FL-1, horizontal) signal from the FL-2 (vertical) channel.

4. Finally the assay samples can be analyzed one by one after selecting the platelet marker (FL-2) positive events in a SSC / FL-2 dot plot.

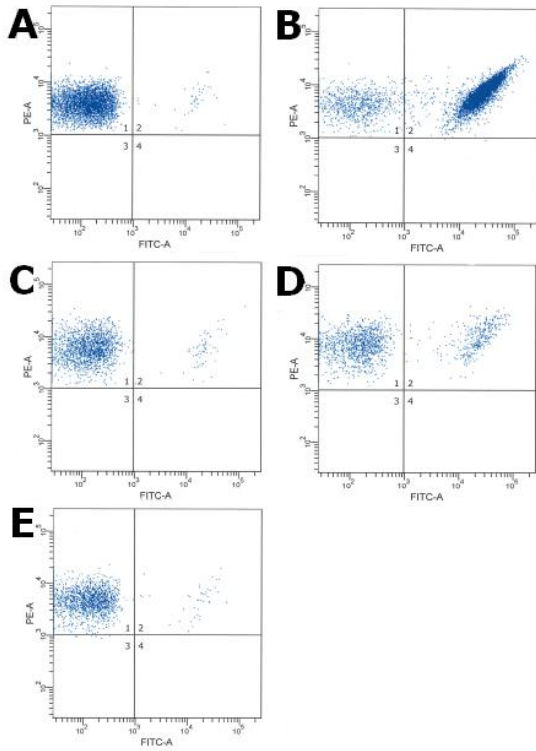
List mode files of at least 10.000 events should be collected for FSC, SSC, and fluorescence signals for both fluorochrome conjugated antibodies with the region gated at the platelets (SSC/R-PE). Less than 10.000 events will influence the accuracy of the assay.

Make sure to select the intermediate positive events also. These are platelet particles that are formed after activation of the platelets.



Cytogram 5. Selection of R-PE-positive platelets in SSC – R-PE plot.

5. The evaluation is done with the use of a quadrant, which is set just below the platelet marker positive population and just right to this population (see Cytogram 6 A, B, C, D and E). The percentage of activated platelets is expressed as percentage of the platelet population. Make sure both regions, the one from Cytogram 1 and the one from Cytogram 5 are both activated.



Cytogram 6. Typical figures from one set of assay samples of a positive patient performed with the HITAlert kit and evaluated on a BD FACSCanto II **A.** unstimulated sample (I.) **B.** Ca-ionophore stimulated sample (II.) **C.** patient sample without heparin (III.) **D.** patient sample with heparin (IV.) and **E.** patient sample with excess of heparin (V.)

Results

The results of the evaluation of patient blood samples are a qualitative and reliable source to determine the presence of heparin complex specific pathogenic antibodies in peripheral blood.

Interpretation

	Patient negative for HIT	Patient very likely to be positive for HIT
Sample I	< 5%	< 5%
Sample II	80-100%	80-100%
Sample III	< 5%	activation (less than) half of sample IV
Sample IV	< 5%	≥ 8%
Sample V	< 5%	activation (less than) half of sample IV

Table 3: Typical results for a patient negative for HIT and a patient positive for HIT. A typical result for a patient positive for HIT obtained with the HITAlert™ Kit is shown in cytogram 6 D. For sample IV intermediate activations can be observed between 5 and 8%, these patient samples should be tested again (see paragraph 'Samples III, IV and V')

Sample I

The unstimulated platelet sample (I.) typically should have less than 1% activation marker positive platelets. When this percentage is higher than 5% the assay should be run again. Preferably with different donor PRP.

Sample II

The Ca-ionophore stimulated sample (II.) typically should have more than 80% activation marker positive platelets. A percentage lower than 80% can be due to the fact that the Ca-ionophore was not completely dissolved yet when used.

Samples III, IV and V

Typical results are shown in table 3. According to table 3, a patient very likely to be positive for HIT should have an activation ≥ 8% in sample IV, comprising the PRP with heparin and patient sample. While a patient negative for HIT should have an activation of < 5 % in sample IV. Occasionally an intermediate activation (5-8%) is observed in sample IV, this patient should be tested again after drawing a new sample and preferably with a different PRP donor.

There are exceptions to table 3:

The patient sample may already contain heparin-antibody complexes from the circulation of the patient.

The number of activation marker positive events in sample IV is ≥ 8%, but there is no significant difference between sample III and IV. Sample V will show an activation that is significantly lower (typically half the activation or lower) than sample IV. The activation of the platelets is heparin dependent in that case and the result is indicative for HIT. (See also limitations of the procedure)

The activation is heparin independent

The number of activation marker positive events in sample IV is ≥ 8%, but there is no 'significant' difference between samples III, IV and V. Addition physiological or high concentration of heparin does not influence the percentage of activated platelets; the activation of the platelets isn't heparin depended and generally the same in all three samples.

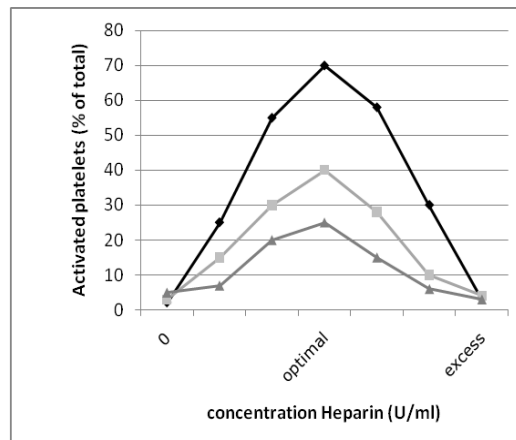


Figure 1: A typical figure for platelet activation at different heparin concentrations. The heparin in Reagent B (in sample IV) is added to the sample in the optimal concentration heparin for activation. The heparin in Reagent G is representing the excess concentration [ref 2]

This HITAlert™ Kit should be used as a screening test. Results should be used in conjunction with clinical findings or other serological tests.

Quality Control

All reagents in the HITAlert™ Kit are subject to quality control.

Limitations of the Procedure

- Personnel experienced in aseptic techniques should perform the collection of the blood sample.
- Personnel should be trained to handle a flow cytometer and know how to interpret the data.
- The HITAlert™ Kit is intended for use in combination with a flow cytometer and *not* for use with a hematology analyzer or immunofluorescence microscope.
- Accurate results with a flow cytometer depend on correct alignment and calibration of laser and detectors. The laboratory should take care of proper calibration and maintenance.
- Quality control procedures should be performed regularly as indicated in the operator’s manual supplied with the flow cytometer.
- This assay might give false positive results when PRP plasma is used from donors that have an A, B or AB positive phenotype. Platelets should be obtained from a O-donor.
- Unreliable results can be expected with patients that (are known to) have a HAMA* response or have cold or autoagglutinins. In the clinical study only samples have been tested from persons without known clotting related diseases, like ITP and others.
- Platelet aggregation and satellitism and red blood cell auto-fluorescence may also result in unreliable results.
- Hemolytic, icteric, lipemic (of an excessive nature), bacterial contaminated specimens, specimens from patients with a myeloma or controls from other test kits have not been tested and can produce erroneous results.
- This HITAlert™ Kit should be used as a screening test. Results should be used in conjunction with clinical findings and other serological tests.

* HAMA= Human Anti Mouse Antibody

Performance Characteristics

Antibody binding specificity

The antibody used in this assay has been typed in the Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshop.

Clinical evaluation

During the clinical study the HITAlert™ Kit has been compared to IVD approved PF4 IgG ELISA (used according to manufacturers’ instructions) at two study sites. Only part of the study is represented here.

In total 195 suspected HIT samples have been tested. Besides the ELISA data, known for all samples, the final clinical diagnosis (n=149) and aggregation (n=44) data were available for part of the samples.

The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve is good practice to compare a diagnostic assay, in this case the HITAlert™ Kit, with the known clinical diagnosis of the samples.

The ROC curve shows the trade-off between the sensitivity (ability to detect the disease) and the specificity (ability to detect lack of disease). To draw the ROC curves the data had to be split in no HIT, low risk of HIT, intermediate risk of HIT and positively diagnosed HIT.

The Receiver Operating Characteristic (ROC) curve indicates that the best cut-off between positive and negative samples is 8% activation. At this level the sensitivity of the assay to discriminate between *NO* HIT and the diagnosis HIT is 78% (95% confidence interval 40% – 97%) and the specificity is 98% (95% confidence interval 91% - 100%). The same 8% cut-off was found in the combination of the samples with the low and intermediate risk 4T scores compared to HIT.

This 8% cut-off is in line with the publication of Tomer et al (2) resulting in a cut-off of 6.6% on a limited number of

samples. The same paper shows a sensitivity of 95% and specificity of 100% when the flow method is compared to the SRA.

At a cut-off of 5% activation the sensitivity is 78% (95% confidence interval 40% – 97%) and the specificity is 87% (95% confidence interval 77% – 94%).

The ROC curves for the comparison of the HITAlert™ Kit against *NO* HIT ('healthy'; area under the curve 0.906 (95% confidence interval 0.790 – 1.023)), low chance (area under the curve 0.884 (95% confidence interval 0.774 – 0.994)) and intermediate chance (area under the curve 0.790 (95% confidence interval 0.610 – 0.970)) are plotted in figure 2. From the respective curves it is clear that the assay discriminates the HIT cases from the negative, the low risk and the intermediate cases.

It can be concluded that the HITAlert™ Kit will positively identify the patients with the highest 4T score.

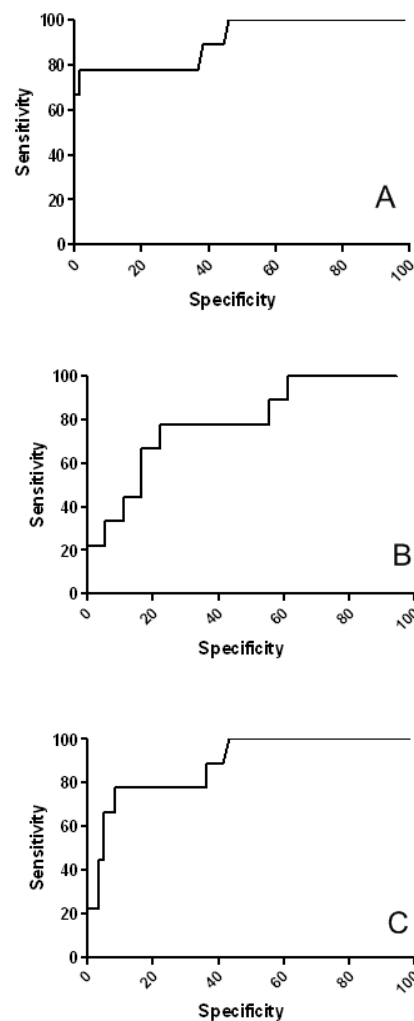


Figure 2. ROC curves of the HITAlert™ Kit data of patients diagnosed positive for HIT against the patients diagnosed negative for HIT (A), against the patients diagnosed with intermediate risk of HIT (B) and against the patients with low risk of HIT (C) (definition by 4T clinical score). Areas under the curve are 0.906 (95% confidence interval 0.790 – 1.023) , 0.790 (95% confidence interval 0.610 – 0.970) and 0.884 (95% confidence interval 0.774 – 0.994) respectively.

Literature

1. Warkentin TE, and Heddle NM. Laboratory Diagnosis of Immune Heparin-induced Thrombocytopenia. *Current Hematology Reports*, 2003;2:148-157.
2. Tomer, A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1997 Sep;98(3):648-56.
3. Tomer A, Masalunga C, and Abshire TC. Determination of heparin-induced thrombocytopenia: a rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody-mediated platelet activation. *Am J Hematol*. 1999 May;61(1):53-61.
4. Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K, Eichler P, and Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes. *J Thromb Haemost*. 2007; 5; 1666.
5. Tomer A. Sensitivity and specificity of laboratory tests for the diagnosis of heparin- induced thrombocytopenia. *Laboratory Hematology*. 1997;3:174-5.
6. Warkentin TE, Sheppard JI, Raschke R, and Greinacher A. Performance characteristics of a rapid assay for anti-PF4/heparin antibodies: the particle immunofiltration assay. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2308-10.
7. NEN EN ISO 15223-1 Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labeling and information to be supplied - Part 1: General requirements.

Warranty

Products sold here under are warranted only to conform to the quantity and contents stated on the label at the time of delivery to the customer. There are no warranties, expressed or implied, which extend beyond the description on the label of the product. IQ Products bv is not liable for property damage, personal injury, or economic loss caused by the product.

Characterization

To ensure consistently high-quality reagents, each batch of monoclonal antibody is tested for conformance with characteristics of a standard reagent.

Vacurette® is a registered trademark of Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria
www.vacurette.qbo.com

Explanation of used symbols

	Consult instructions for use
	Catalogue number
	Sufficient for
	In Vitro Diagnostic medical device
	Caution, consult accompanying document
	Keep away from (sun)light
	Biological risks
	Temperature limitation (°C)
	For Research Use Only
	Batch code
	Use by yyyy-mm-dd
	Manufacturer
	Authorized Representative in the European Community
	Conformité Européenne (European Conformity)

Contact information

IQ Products BV
www.iqproducts.nl

Rozenburglaan 13a
 9727 DL Groningen
 The Netherlands
 T +31 (0)50 5757000
 F +31 (0)50 5757002
marketing@iqproducts.nl

This product is registered as “in vitro diagnostic use” in the countries that belong to the European Community. In all other countries it should be labeled “for research use only”.

©2019 - IQ Products bv. All rights reserved. No parts of these works may be reproduced in any form without permissions in writing.

HITAlert™ KIT

REF 7 IQP-396 ▼ 30 tests
 IVD CE Dispositif médical de diagnostic in vitro

Ce produit est protégé par le brevet américain N°5,763,201. IQ Products a une licence exclusive pour ce produit.

Utilisation

HITAlert™ Kit est un test de détection des anticorps spécifiques du complexe héparine qui sont capables d'activer les thrombocytes (plaquettes) et peuvent engendrer une thrombopénie induite à l'héparine (TIH).

Principe du test

La thrombopénie induite à l'héparine (TIH) est un syndrome pour lequel la détection en laboratoire de ses anticorps spécifiques constitue un diagnostic très utile. Ce test d'activation des plaquettes qui détecte les anticorps sur la base de leurs propriétés d'activation des plaquettes est différent par rapport aux tests d'antigènes qui mesurent les anticorps dirigés contre les complexes héparine-Facteur 4 plaquettaire (PF4) ou les complexes polyanion-PF4. Une partie des anticorps pathogènes peuvent être spécifiques des complexes Héparine basée sur l'héparine et l'interleukine 8 ou l'héparine et le peptide 2 activant les neutrophiles. Le kit HITAlert™ kit détecte les anticorps reconnaissant le complexe héparine indépendamment de la seconde molécule et détecte uniquement les anticorps capables d'induire l'activation des plaquettes. Les anticorps qui lient le complexe sont capables de fixer le récepteur Fcγ II des plaquettes et d'activer les plaquettes.

Le test HITAlert™ kit nécessite des plaquettes de donneur (PRP) incubées avec le sérum du patient en présence ou en absence d'héparine. Après incubation des échantillons avec un anticorps anti-plaquettes et le marqueur d'activation, la réaction est mesurée par cytométrie de flux. Pour évaluer les échantillons colorés il faut disposer d'un cytomètre de flux standard avec son programme capable de détecter la fluorescence FITC (FL-1) et R-PE (FL-2).

Le kit HITAlert™ kit doit être utilisé comme test de dépistage. Les résultats doivent toujours être interprétés en fonction des données cliniques et des autres tests sérologiques.

Pour chaque patient suspecté de TIH, une série d'échantillons doit être testée.

- I. Echantillon PRP de donneur avec héparine; pour évaluer le bruit de fond de l'activation due à la manipulation et exclure les donneurs de PRP qui seraient TIH positifs.
- II. Echantillon PRP avec ionophore Ca; pour avoir des thrombocytes activés utilisés pour ajuster le cytomètre de flux.
- III. Echantillon PRP de donneur avec un sérum de patient pour démontrer le bruit de fond de l'activation due au sérum.
- IV. Echantillon PRP de donneur avec un sérum de patient et une concentration physiologique d'héparine pour montrer l'activation due à la présence des anticorps liant le complexe héparine.
- V. Echantillon PRP de donneur avec le sérum du patient et un excès d'héparine. Cet échantillon doit montrer une diminution de l'activation des plaquettes si l'échantillon à tester est positif de type IV car les complexes sont rompus en présence d'une concentration élevée d'héparine. Il est recommandé de toujours inclure un échantillon d'un patient positif TIH de type II (matériel non fourni).

Composition du coffret HITAlert™ kit

Réactif A	Tampon	5 ml
Réactif B	Héparine	150 µl
Réactif C	Activateur Plaquettaire (Ca Ionophore)	1 flacon
Réactif D	Tampon de coloration	20 ml
Réactif E	Marqueur de plaquette (Anticorps monoclonal)	200 µl
Réactif F	Marqueur d'activation plaquettaire (Protéine Recombinante)	200 µl
Réactif G	Héparine à 1000 U/ml	150 µl
Tubes en PP 2,2 ml pour incubation des échantillons		30

Chaque kit contient la quantité suffisante de réactifs pour 6 patients (30 tests).

Matériels nécessaires non fournis

- Cytomètre de flux.
- Tube citraté pour prélèvement de sang, par exemple; tubes Greiner Vacuette Réf. 454382.
- Tubes pour cytométrie de flux.
- Ethanol à 70% ou 96%.
- Agitateur (par exemple agitateur de plaque ELISA ou agitateur de plaquettes).
- Centrifugeuse de laboratoire.
- Micropipettes à volume variable et embouts.

Conservation

Dès réception, stocker le kit à 2 °C à 8 °C et le protéger de la lumière directe du soleil.

Les réactifs, conservés dans les conditions indiquées dans la notice d'utilisation, sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Pour un usage répété, les réactifs doivent être stockés à 2 °C à 8 °C immédiatement après usage sauf pour le réactif C qui doit être stocké à -20 °C après dissolution.

Avertissement et précautions

Les réactifs contiennent de l'azote de sodium pouvant réagir avec les canalisations en plomb en formant des complexes métalliques explosifs. Leur élimination doit être effectuée par rinçage abondant à l'eau pour éviter leur formation.

Tous les réactifs doivent être manipulés selon des recommandations de bonnes pratiques de laboratoire en prenant les précautions appropriées.

Ne pas pipeter avec la bouche et porter des gants pendant le test.

La substitution de composants autres que ceux du kit peut engendrer des résultats erronés ou inconsistants.

Le test doit être exécuté par du personnel bien formé et qualifié. Contacter le fabricant si le kit original est détérioré.

Caractéristiques du cytomètre de flux

- Vérifier que le cytomètre de flux est correctement calibré selon les recommandations du fabricant.
- Il est conseillé de calibrer et d'effectuer la maintenance de l'instrument de manière régulière.
- Le cytomètre de flux doit être utilisé par du personnel qualifié. L'évaluation des résultats doit être effectuée par du personnel formé à l'interprétation par cytométrie de flux.

Prélèvement et préparation des échantillons

Plasma riche en plaquettes (PRP)

Tous les donneurs de plaquettes n'ont pas les plaquettes adéquates pour que leur PRP soit utilisé dans le cadre d'un essai fonctionnel. Le PRP de différents donneurs doit être analysé par rapport à un échantillon de patient positif au TIH connu. Le donneur qui convient le mieux donnera l'activation la plus élevée de l'échantillon IV (échantillon de patient avec concentration physiologique d'héparine). Il est également important de sélectionner les mêmes donneurs de plaquettes à l'aide d'un échantillon négatif au TIH connu.

Il est important que le donneur de plaquettes n'ait pas pris d'inhibiteurs de plaquettes, tels que l'aspirine, ou de médicaments anti-inflammatoires, tels que l'Ibuprofen, l'Advil, etc. 3 à 4 jours avant le prélèvement sanguin. Ces agents peuvent faire échouer l'essai, bien que le réactif C puisse rester efficace.

Préparation du plasma enrichi en plaquette (PRP)

- Collecter du sang veineux de donneur de type O dans un tube avec citrate exemple: Réf.454382, Vacuette Greiner), à l'aide une aiguille de prélèvement stérile.
- Mélanger le sang avec le citrate une seule fois en agitant le tube de bas en haut. Ne pas agiter plus que nécessaire.
- L'échantillon de sang doit être stocké à température ambiante (20 °C à 25 °C) et utilisé directement après prélèvement.
- Centrifuger le sang 5 minutes à 100 g avec une accélération faible et sans freinage.
- Retirer le bouchon et récupérer dans un tube propre le surnageant jaune, il s'agit du PRP. Prélever suffisamment au dessus du culot de globules blancs et rouges! Les globules rouges et blancs sont un inconvénient pour le test.
- Utiliser le PRP dans les 2 heures qui suivent sa production.

Traitement de l'échantillon frais d'un patient

- Collecter le sang veineux du patient dans un tube (sérum) sans additif (exemple Réf.454045, Greiner Vacuette), à l'aide d'une aiguille stérile.
- Collecter le sérum et laisser coaguler pendant 30 minutes avant de centrifuger le tube pendant 20 minutes à température ambiante à 1000 g.
- Retirer le bouchon et récupérer dans un tube propre le liquide surnageant jaune, il s'agit du sérum. Prélever suffisamment au dessus du culot de globules blancs et rouges.
- L'échantillon de sérum doit être conservé à température ambiante (20 °C à 25 °C) avant le test.
- Utiliser l'échantillon de sérum dans les 12 heures suivant le prélèvement. Le sérum peut être stocké pour une période plus longue en le congelant à -80 °C.

Traitement de l'échantillon congelé d'un patient

- Le sérum congelé des patients peut également être utilisé lorsque par exemple l'échantillon doit être analysé ailleurs. Il est recommandé d'utiliser du sérum qui n'a été congelé qu'une seule fois.
- Stocker les échantillons dans de la glace après décongélation.
- Centrifuger les échantillons avant utilisation à vitesse élevée pour éliminer les agrégats ou les filtrer à l'aide d'un filtre de centrifugation de 0,2 µm (ex: VWR 516-0233).

Procédure du test HITAlert™

Ne préchauffez ou ne chauffez pas (inactivé par la chaleur) le sérum des patients.

1. Dissolvez le réactif C dans 200 µl d'éthanol à 70 % ou à 96 %. Il s'agit de la solution mère du réactif C.
2. Agitez bien la solution mère du réactif C au vortex ou dans un mélangeur.
3. Le réactif C se dissout complètement dans l'éthanol en 15 à 30 minutes. Une petite précipitation peut survenir dans le liquide dissout.
4. Cette solution mère du réactif C peut être directement utilisée pour l'essai. Étiquetez correctement la fiole et stockez à -20 °C la solution mère du réactif C après utilisation afin qu'elle puisse également être utilisée lors des essais ultérieurs du kit.

Incubation de l'échantillon

5. Il est important que toutes les étapes soient exécutées dans le bon ordre et avec soin. Une agitation trop agressive peut diminuer la fiabilité du test.
6. Effectuer la première étape d'incubation (Tableau 1) dans les tubes de 2,2 mL fournis avec le kit.
7. Effectuez l'essai en ajoutant les réactifs de gauche à droite au fond d'une fiole de 2 ml (S'assurer de bien utiliser un nouvel embout pour chaque étape de pipetage):

test	Réactif A	PRP	Patient	Réactif B	Réactif G	Réactif C
I	35 µl	10 µl	---	5 µl	---	---
II	35 µl	10 µl	---	---	---	5 µl
III	30 µl	10 µl	10 µl	---	---	---
IV	25 µl	10 µl	10 µl	5 µl	---	---
V	25 µl	10 µl	10 µl	---	5 µl	---

Table1. Composants à ajouter ensemble pour l'incubation de l'échantillon.

- I: PRP avec héparine
 II: PRP avec ionophore Ca
 III: PRP avec échantillon du patient
 IV: PRP avec échantillon du patient et héparine
 V: PRP avec échantillon du patient et héparine à 100 U/ml

8. Mélanger la suspension soigneusement en effectuant des pipetages répétés; éviter la formation de bulles d'air.
9. Incuber les tubes à 20 °C à 25 °C sur un agitateur orbital horizontal pendant une heure. La vitesse de l'agitateur doit être juste suffisante pour obtenir un léger mouvement des échantillons. Éviter la formation de bulles d'air.

Coloration des échantillons

10. Identifier 5 tubes pour cytométrie de flux de I, à V.
11. Dans un nouveau tube, mélangez 210 µl de réactif D, 30 µl de réactif E et 30 µl de réactif F et mélangez bien.
12. Ajoutez 45 µl de ce mélange à chaque tube de l'étape 10. Stocker les tubes à l'obscurité en attendant que le volume d'échantillon incubé puisse être rajouté.
13. Après une incubation d'une heure (Etape 9), ajouter 5 µl du mélange de l'échantillon à tester dans les tubes correspondants avec la solution de coloration.

Mélanger les échantillons soigneusement en effectuant des pipetages répétés. Eviter la formation de bulles d'air. Incuber le mélange à l'obscurité pendant 15 minutes à température ambiante (20 °C à 25 °C).

14. Ajouter 400 µL de réactif D dans le tube.
15. Les cellules sont désormais prêtes pour l'acquisition et l'évaluation par cytométrie de flux. Veuillez acquérir les données aussi rapidement que possible, et 30 minutes maximum suivant l'ajout du réactif D.

Collecte des données

Ajustement du cytomètre de flux

Trois tubes sont utilisés pour l'ajustement du cytomètre de flux (Tableau 2).

- Les trois tubes pour cytométrie sont identifiés respectivement S1, S2 et S3.
- Ajouter les différents composants dans les tubes selon le Tableau 2. S'assurer d'avoir bien ajouté 5 µl d'échantillon de type II dans le tubes S1, S2 et S3.
- Mélanger les tubes soigneusement en pipetant plusieurs fois sans faire de bulles. Incuber 15 minutes à l'obscurité à température ambiante.
- Ajouter 400 µl de réactif D dans chaque tube.
- Les cellules sont maintenant prêtes à être utilisées pour l'ajustement du cytomètre.

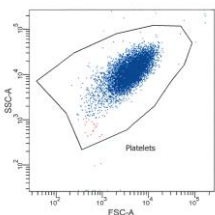
Tube	Echantillons (5 µl)	Réactif D	Réactif E	Réactif F
S1	II	45 µl	---	---
S2	II	40 µl	5 µl	---
S3	II	40 µl	---	5 µl

Tableau 2. Composants à ajouter pour l'ajustement du cytomètre de flux. Les plaquettes sont utilisés à partir de l'échantillon de type II (Etape 4).

Analyse

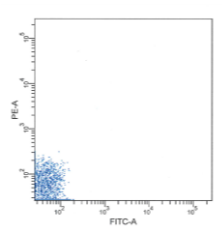
1. Créez trois dot plots, un dot plot zone de dispersion avant (FSC) vs. zone de dispersion latérale (SSC) à échelle logarithmique pour sélectionner les plaquettes, un dot plot R-PE vs. SSC pour sélectionner les événements positif du marqueur de plaquettes et un dot plot FITC vs. R-PE afin de déterminer l'activation des plaquettes.
2. Ajuster le voltage pour le FSC-SSC en utilisant le tube S1.

Sélectionner toutes les plaquettes en utilisant une région et exclure les débris et le bruit de fond en ajustant le seuil FSC approprié (voir le cytogramme 1). N'imposez pas une limite trop étroite dans le coin inférieur gauche. Après activation, une partie des plaquettes vont diminuer de taille (microvésicules). Cette limite peut être contrôlée à l'aide du marqueur d'activation et des cellules positives au marqueur des plaquettes de l'étape 5. Activer la région pour poursuivre l'étape suivante de l'évaluation.



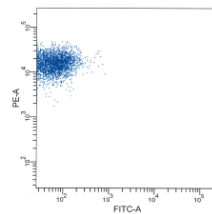
Cytogramme 1. SSC (vertical) / FSC (horizontal) et région à sélectionner pour les plaquettes.

L'échantillon S1 est aussi utilisé pour ajuster les voltages (TPM) FL-1 et FL-2. Créez un dot plot FL-1/FL-2 et placez les signaux de référence FL-1/FL-2 dans le coin inférieur gauche d'un dot plot FL-1 vs. FL-2 (voir Cytogramme 2).

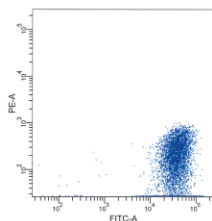


Cytogramme 2. Ajustement correct des voltages du TPM pour les échantillons non colorés FL-2 (vertical) et FL-1 (horizontal).

3. les échantillons S2 et S3 sont utilisés pour l'ajustement de la compensation. Ces réglages de compensation entre les signaux de fluorescence FITC (FL-1) et R-PE (FL-2) devraient être optimisés pour séparer correctement les plaquettes stimulées (FL-1 positives) de celles non stimulées (FL-1 négatives).
 - a. Utiliser l'échantillon S2 pour ajuster la compensation du canal R-PE (FL-2) par rapport au canal FITC (FL-1) (voir le cytogramme 3).
 - b. Utiliser l'échantillon S3 pour ajuster la compensation du canal FITC (FL-1) par rapport au canal R-PE (FL-2) (voir le cytogramme 4).



Cytogramme 3. Compensation du signal R-PE (FL-2, vertical) à partir du canal FL-1 (horizontal).

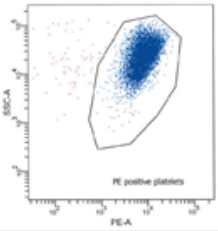


Cytogramme 4. Compensation du signal FITC (FL-1, horizontal) à partir du canal FL-2 (vertical).

4. Enfin, les échantillons d'essai peuvent être analysés un à un après avoir sélectionné les événements positifs au marqueur des plaquettes (FL-2) du dot plot SSC / FL-2.

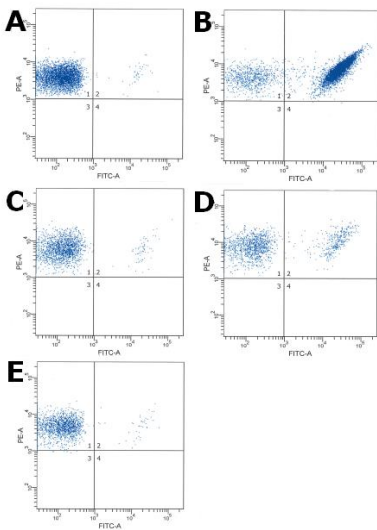
List mode files de 10.000 événements, au minimum, doivent être collectés pour l'analyse des paramètres FSC, SSC, et intensité de fluorescence pour les deux fluorochromes, sur la population de plaquettes sélectionnée. Un nombre inférieur à 10.000 événements aura une incidence sur la précision de l'analyse.

Assurez-vous d'avoir également sélectionné les événements positifs intermédiaires. Il s'agit des particules de plaquette formées après l'activation des plaquettes.



Cytogramme 5. Sélection des plaquettes R-PE-positives dans le SSC – R-PE plot.

5. L'évaluation est effectuée en utilisant un quadrant, juste au dessus de la population positive pour le marqueur de plaquette et juste à droite de cette population (voir le cytogramme 6 A, B, C et D). Le pourcentage de plaquettes activées est exprimé en pourcentage de la population de plaquettes. Assurez-vous que les régions du Cytogramme 1 et du Cytogramme 5 sont activées.



Cytogramme 6. Figures typiques d'une série de tests d'échantillons de patients positifs avec le kit HITAlert™ kit évalué sur le cytomètre BD FACSCanto II.

- A. Echantillon non stimulé (I.)
- B. Echantillon stimulé par le Ca-ionophore (II.)
- C. Echantillon de patient sans héparine (III.)
- D. Echantillon de patient avec héparine (IV.)
- E. Echantillon de patient avec un excès d'héparine (V.)

Résultats

Les résultats de l'évaluation des échantillons de sang de patients sont une source qualitative et fiable de détermination de la présence d'anticorps pathogènes spécifiques dans le sang périphérique.

Interprétation

	Patient négatif pour le TIH	Patient très probablement positif pour le TIH
Echantillon de type I	< 5%	< 5%
Echantillon de type II	80-100%	80-100%
Echantillon de type III	<5%	Activation (de moins de) la moitié de l'échantillon IV
Echantillon de type IV	<5%	≥ 8%
Echantillon de type v	<5%	Activation (de moins de) la moitié de l'échantillon IV

Tableau 3: Résultats typiques de patients négatifs et positifs pour le THI. Un résultat typique de patient positif pour le THI avec le kit HITAlert™ kit est présenté dans le cytogramme 6D. Pour des échantillons IV, des activations intermédiaires peuvent être observées entre 5 et 8%, ces échantillons de patients doivent être à nouveau testés (voir paragraphe 'échantillons III, IV et V').

Echantillon type I

L'échantillon de plaquettes non stimulées (type I) devrait avoir typiquement moins de 1% de plaquettes positives pour le marqueur d'activation. Si ce pourcentage est supérieur à 4%, le test doit être répété. De préférence avec le PRP d'un donneur différent.

Echantillon type II

L'échantillon stimulé par le Ca-ionophore (type II) devrait avoir typiquement plus de 80% de plaquettes positives pour le marqueur d'activation. Un pourcentage inférieur à 80% peut être dû au fait que le ionophore-Ca n'était pas encore complètement dissous au moment de son utilisation.

Echantillons types III, IV et V

Les résultats typiques sont décrits dans le Tableau 3. Selon le tableau 3, un patient très susceptible d'être positif au TIH devrait avoir une activation ≥ 8% dans l'échantillon IV, comprenant le PRP avec l'héparine et l'échantillon de patient. Un patient négatif pour HIT devrait avoir une activation de <5% dans l'échantillon IV. Parfois, une activation intermédiaire (5 à 8%) est observée dans l'échantillon IV. Ce patient doit être soumis à un nouveau test avec un nouvel échantillon de sang et de préférence avec un donneur de PRP différent.

Il existe des exceptions par rapport au Tableau 3:

L'échantillon du patient peut déjà contenir des complexes circulant anticorps-héparine.

Le nombre d'événements positifs du marqueur d'activation de l'échantillon de type IV est supérieur ou égal à 8% mais il n'y a pas de différence significative entre les échantillons de type III et de type IV. L'échantillon de type V montre une activation significativement plus faible (typiquement la moitié ou moins de l'activation) que l'échantillon de type IV. L'activation des plaquettes est héparine dépendante dans ce cas et le résultat est indicatif d'une THI (Voir aussi Limites de la procédure).

L'activation de l'héparine est indépendante.

Le nombre d'événements positifs du marqueur d'activation est supérieur ou égal à 8% mais il n'y a pas de différence significative entre les échantillons des types III, IV et V. L'addition d'une concentration élevée ou physiologique d'héparine n'influence pas le pourcentage de plaquettes activées. L'activation des plaquettes n'est pas héparine dépendante et en général la même pour les trois types d'échantillon.

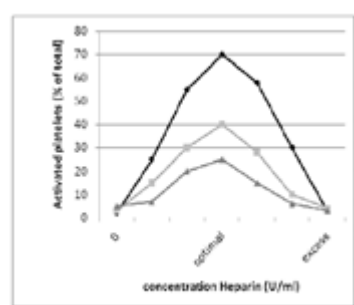


Figure 1: Tableau typique de l'activation plaquettaire à différentes concentrations d'héparine. L'héparine du réactif B (de l'échantillon de type IV est ajoutée à l'échantillon avec la concentration optimale d'héparine pour l'activation. L'héparine du réactif G représente un excès de concentration. [2]

Le test HITAlert™ kit devrait être utilisé comme test de dépistage. Les résultats devraient être utilisés en conjonction avec les données cliniques et les autres tests sérologiques.

Contrôle de qualité

Tous les réactifs du kit HITAlert™ kit sont soumis à un contrôle de qualité.

Limites du test

- Le prélèvement de l'échantillon de sang doit être effectué par du personnel expérimenté.
- Le personnel doit être entraîné à la manipulation du cytomètre de flux et savoir interpréter les données.
- Le kit HITAlert™ kit est destiné à un usage avec un cytomètre de flux et non pas un analyseur d'hématologie ou un microscope à fluorescence.
- Les résultats fiables avec un cytomètre de flux dépendent du bon alignement et de la calibration du laser et des détecteurs. Le laboratoire devrait prendre soin d'effectuer une calibration appropriée et une maintenance.
- Les procédures de contrôle de qualité devraient être effectuées régulièrement comme indiqué dans le manuel d'utilisation fourni avec le cytomètre de flux.
- Ce test donne des résultats faussement positifs si le PRP utilisé est issu de plasma de donneurs de groupe sanguin A, B ou AB. Les plaquettes devraient être obtenues à partir de donneurs de groupe sanguin O.
- Des résultats non fiables sont possibles avec des patients qui sont connus pour avoir une réponse HAMA* ou froide ou des auto-agglutinines. Dans l'étude clinique, seuls les échantillons de personnes non connues pour avoir des maladies de la coagulation comme l'ITP ou autres, ont été testés.
- L'aggrégation plaquettaire, le satellitisme et l'auto-fluorescence des globules rouges peuvent aussi engendrer des résultats erronés.
- Les échantillons hémolytiques, ictériques, lipidiques (de nature excessive), les échantillons de contamination bactérienne, les échantillons de patients avec myélomes ou les contrôles d'autres kits n'ont pas été testés et peuvent engendrer des résultats erronés.
- Le test HITAlert™ devrait être utilisé comme test de dépistage. Les résultats doivent être utilisés en conjonction avec les données cliniques et les autres tests sérologiques.

* HAMA = Human Anti Mouse Antibody

Performances

Spécificité de l'anticorps de liaison

L'anticorps utilisé dans ce test a été typé selon le Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshop.

Evaluation clinique

Lors de l'étude clinique le kit HITAlert™ a été comparé au kit IVD PF4 IgG ELISA (utilisé selon les instructions du fabricant sur deux sites de l'étude). Une partie de l'étude est décrite ici. Un panel de 195 échantillons de patients suspectés de TIH ont été testés. En plus des résultats ELISA connus pour tous les échantillons, le diagnostic clinique final (n=149) et les données d'agrégation (n=44) étaient disponibles pour une bonne partie des échantillons.

La courbe de ROC est une bonne méthode pour comparer un test de diagnostic, comme le kit HITAlert™, par rapport aux échantillons cliniquement connus. La courbe de ROC montre bien le comportement du kit en termes de sensibilité (capacité à détecter la maladie) et de spécificité (capacité à détecter l'absence de la maladie). Pour construire la courbe de ROC, les données ont été classées ; absence de TIH, faible risque de TIH, risque modéré de TIH et diagnostic positif de TIH.

La courbe de ROC montre que le meilleur seuil entre les échantillons négatifs et les échantillons positifs correspond à une activation de 8%. Pour ce seuil, la sensibilité du test à différencier les TIH négatives des TIH positives est de 78% (95% Intervalle de confiance à 95%: 40% – 97%) et la spécificité de 98% (Intervalle de confiance à 95%: 91% - 100%). Le même seuil de 8% a été trouvé pour les échantillons à risque faible ou modéré de score clinique 4T pour la TIH.

Ce seuil de 8% est en phase avec la publication de Tomer et al(2) donnant un seuil de 6,6% avec un nombre limité d'échantillons. La même publication donne une sensibilité de 95% et une spécificité de 100% quand la méthode de cytométrie est comparée au test SRA.

À une limite d'activation de 5%, la sensibilité est de 78% (intervalle de confiance à 95% de 40% à 97%) et la spécificité est de 87% (intervalle de confiance à 95% de 77% à 94%).

Les courbes de ROC pour la comparaison du kit HITAlert™ kit par rapport à l'absence de THI (« sujet sain », zone sous la courbe 0,906 (Intervalle de confiance à 95%: 0,790 – 1,023)), risque faible (zone sous la courbe 0,884 (Intervalle de confiance à 95%: 0,774 – 0,994)) et risque modéré (zone sous la courbe 0,790 (intervalle de confiance à 95%: 0,610 – 0,970)) sont rapportés dans la Figure 3. Selon les courbes respectives, il est clair que le test discrimine les cas de THI négatifs des cas à risque faibles ou modérés.

Il peut être conclu que le kit HITAlert™ kit identifie positivement les patients avec un score supérieur à 4T.

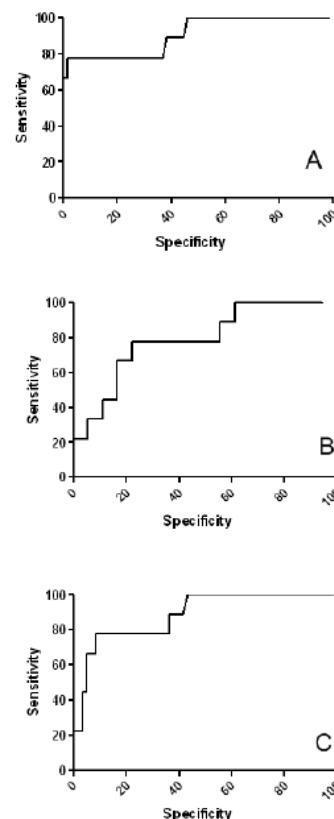


Figure 2. Courbes de ROC des données du kit HITAlert™ kit de patients diagnostiqués positifs pour la THI et négatifs pour la THI (A), de patients diagnostiqués avec un risque modéré de THI (B) et de patients avec un risque faible de THI (C) (définition selon le score clinique 4T). Les zones au dessous de la courbe sont respectivement 0,906 (Intervalle de confiance à 95%: 0,790– 1,023), 0,790 (Intervalle de confiance à 95%: 0,610 – 0,970) et 0,884 (Intervalle de confiance à 95%: 0,774 – 0,994).

Références

1. Warkentin T.E., and Heddle N.M. Laboratory Diagnosis of Immune Heparin-induced Thrombocytopenia. *Current Hematology Reports*, 2003;2:148-157.
2. Tomer, A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1997 Sep;98(3):648-56.
3. Tomer A., Masalunga C., and Abshire T.C. Determination of heparin-induced thrombocytopenia: a rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody-mediated platelet activation. *Am J Hematol*. 1999 May;61(1):53-61.
4. Greinacher A., Juhl D., Strobel U., Wessel A., Lubenow N., Selleng K., Eichler P., and Warkentin T.E. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes. *J Thromb Haemost*. 2007;5; 1666.
5. Tomer A. Sensitivity and specificity of laboratory tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Laboratory Hematology*. 1997;3:174-5.
6. Warkentin T.E., Sheppard J.I., Raschke R., and Greinacher A. Performance characteristics of a rapid assay for anti-PF4/heparin antibodies: the particle immune filtration assay. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2308-10.
7. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labeling of medical devices.

Garantie















Les produits vendus ici sont garantis uniquement pour le contenu et la quantité indiqués sur l'étiquette au moment de la livraison chez le client. Il n'y a pas de garantie, expresse ou implicite qui dépasse les indications de l'étiquette. IQ Products BV n'est pas responsable des dommages de propriété, de blessures de personnes, ou de perte économique due au produit.

Caractérisation

Pour assurer en permanence des produits de très grande qualité, chaque lot d'anticorps monoclonal est testé pour sa conformité aux caractéristiques d'un réactif standard.

Vacurette® est une marque déposée de Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Autriche
www.vacurette.gbo.com

Signification des symboles utilisés

	Consulter les instructions d'utilisation
	Référence du catalogue
	Suffisant pour
	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Attention voir notice d'instructions
	Ne pas exposer aux rayons (solaires)
	Risques biologiques
	Limites de température (°C)
	Pour la recherche uniquement
	Code du lot
	Utiliser jusque
	Fabricant
	Mandataire dans la Communauté européenne
	Conformité Européenne

Informations de contact

 IQ Products BV
 Rozenburglaan 13a
 9727 DL Groningen
 Pays Bas
 Tél. +31 (0)50 5757000
 Fax +31 (0)50 5757002
marketing@iqproducts.nl

Ce produit est enregistré pour "diagnostic in vitro" dans les pays de la Communauté Européenne. Dans les autres pays, il sera utilisé comme produit de recherche et libellé « for research use only ».

Ce produit est protégé par le brevet US N° 5,763,201. IQ Products BV est l'exploitant exclusif de la licence.

©2019 - IQ Products BV. Tous droits réservés. Aucune partie de ces travaux ne peut être reproduit sous quelque forme que se soit sans permissions écrites.

HITAlert™ Kit

REF⁷ IQP-396 ▽ 30 Tests  Packungsbeilage
 IVD  In-vitro-Diagnostikum

Dieses Produkt ist durch das US-Patent 5.763.201 geschützt. IQ Products ist alleiniger Lizenznehmer dieses Patents.

Verwendungszweck

Das HITAlert™ Kit wird zum Nachweis von für Heparinkomplexe typischen Antikörpern verwendet, die in der Lage sind, Thrombozyten (Blutplättchen) zu aktivieren, und zur Entwicklung einer immunologischen heparin-induzierten Thrombozytopenie führen können.

Testprinzip

Die immunologische heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist ein spezifisches Syndrom, bei dem der Labornachweis von pathogenen HIT-Antikörpern in der Diagnostik hilfreich ist. Dieser Plättchen-Aktivierungstest, der Antikörper anhand ihrer charakteristischen Plättchenaktivierungseigenschaften nachweist, unterscheidet sich von den Antigen-Tests, die Antikörper messen, die auf Plättchenfaktor 4-(PF4)-Heparinkomplexe oder PF4/Polyanion-Komplexe reagieren. Ein Teil der pathogenen Antikörper kann jedoch spezifisch für Heparinkomplexe auf Heparin- und Interleukin-8-Basis oder auf Basis von Heparin und dem Neutrophile-aktivierenden Peptid 2 sein. Das HITAlert™ Kit zeigt Antikörper, die Heparinkomplexe unabhängig vom zweiten Molekül erkennen, und zeigt nur die Antikörper, die in der Lage sind, eine Aktivierung der Blutplättchen auszulösen. Die Antikörper, die sich an den Komplex binden, sind in der Lage, sich an den Fcγ-Rezeptor II auf dem Blutplättchen zu binden und das Blutplättchen zu aktivieren.

Für das HITAlert™ Kit werden Blutplättchen (PRP) von Spendern verwendet, die mit dem Patientenserum und mit oder ohne Heparinzugabe inkubiert werden. Wenn pathogene Antikörper vorhanden sind, wird die Aktivierung der Spender-Plättchen durch einen Marker für die Plättchenaktivierung angezeigt. Durch die Inkubation der Proben mit einem Antikörper gegen Blutplättchen und mit dem Aktivierungsmarker kann diese Reaktion mithilfe von Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden. Für die Auswertung der gefärbten Probe ist ein standardmäßiges Durchflusszytometer, das in der Lage ist, die Fluoreszenzen FITC (FL-1) und R-PE (FL-2) zu erkennen, sowie die entsprechende Software erforderlich.

Dieses HITAlert™ Kit sollte als Screening-Test verwendet werden. Die Ergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit den klinischen Befunden oder anderen serologischen Tests verwendet werden.

Bei jedem Patienten mit Verdacht auf HIT werden mehrere Proben getestet:

- I. Eine Probe des Spender-PRP mit Heparin; um die Aktivierung im Hintergrund aufgrund der Bearbeitung zu zeigen und um auszuschließen, dass der PRP-Spender HIT-positiv ist.
- II. Eine Probe des PRP mit Ca-Ionophor; um aktivierte Thrombozyten zu gewinnen, die für die Einstellung des Durchflusszytometers verwendet werden können.
- III. Eine Probe des Spender-PRP mit Patientenserum; um die Aktivierung „im Hintergrund“ aufgrund des Serums zu zeigen.
- IV. Eine Probe des Spender-PRP mit Patientenserum und einer physiologischen Heparinkonzentration; um die Aktivierung aufgrund der Anwesenheit von Antikörpern, die sich an den Heparinkomplex binden, zu zeigen.

- V. Eine Probe des Spender-PRP mit Patientenserum und einem Überschuss an Heparin; diese Probe sollte einen Rückgang der Plättchenaktivierung im Fall einer positiven Probe IV zeigen, da Immunkomplexe bei einer hohen Heparinkonzentration gestört werden.

Es ist empfehlenswert, stets eine Probe eines bekannten HIT-II-positiven Patienten einzubeziehen (NICHT im Lieferumfang enthalten).

Inhalt HITAlert™ Kit

Reagens A	Testpuffer	5 ml
Reagens B	Heparin	150 µl
Reagens C	Plättchen-Aktivator (Ca-Ionophor)	1 Phiole
Reagens D	Färbepuffer	20 ml
Reagens E	Plättchen-Marker (monoklonaler Antikörper)	200 µl
Reagens F	Marker für Plättchenaktivierung (rekombinantes Protein)	200 µl
Reagens G	Heparin 1000 U/ml	150 µl
2,2 ml PP-Phiole zur Inkubation der Probe		30

Die Reagenzien in jedem Kit reichen zum Testen von 6 Patienten (30 Tests).

Erforderliches, jedoch nicht mitgeliefertes Labormaterial

- Durchflusszytometer
- Citratblut-Röhrchen, zum Beispiel Greiner Vacuette 454382
- Röhrchen, die auf das Durchflusszytometer passen
- 70 %-iges oder 96 %-iges Ethanol
- Rüttler (zum Beispiel ELISA-Plattenrüttler oder Thrombozytenagitator)
- Laborzentrifuge
- Verstellbare Mikropipetten und Spitzen

Lagerung

Kit nach Erhalt bei 2 bis 8 °C lagern. Direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Reagenzien, die gemäß den angegebenen Lagerungshinweisen aufbewahrt werden, sind bis zum Haltbarkeitsdatum auf dem Etikett stabil. Bei mehrmaliger Verwendung Reagenzien sofort nach Gebrauch wieder bei 2 bis 8 °C aufbewahren; Reagens C in gelöstem Zustand bei -20 °C.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Reagenzien mit Natriumazid können bei Kontakt mit Blei- und Kupferrohren explosive Metallazide bilden. Bei der Entsorgung mit viel Wasser nachspülen, um Azidansammlungen zu vermeiden. Die Reagenzien sind entsprechend der guten Laborpraxis zu verwenden. Es ist die entsprechende Vorsicht walten zu lassen. Beim Umgang mit den Patientenproben sind zusätzlich geeignete Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen. Nicht mit dem Mund pipettieren. Während des Verfahrens sind Handschuhe zu tragen.

Der Austausch von Komponenten mit nicht im Kit enthaltenen Substanzen kann zu widersprüchlichen oder falschen Ergebnissen führen. Der Test ist von gut geschulten, autorisierten Labortechnikern durchzuführen. Bei Beschädigungen am Original-Kit kontaktieren Sie bitte den Hersteller.

Geräteanforderungen

- Durchflusszytometer auf korrekte Kalibrierung entsprechend der Herstelleranweisungen überprüfen.
- Es wird empfohlen, das Gerät regelmäßig zu kalibrieren und zu warten.
- Das Durchflusszytometer sollte von einem dafür ausgebildeten Techniker bedient werden. Die Auswertung der Ergebnisse sollte durch eine Fachkraft erfolgen, die dazu ausgebildet ist, die Daten des Durchflusszytometers zu interpretieren.

Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Plättchenreiches Plasma (PRP)

Nicht alle Plättchenspender haben geeignete Plättchen für die Herstellung von PRP zur Verwendung für funktionelle Assays. Es sollte PRP von mehreren verschiedenen Spendern mit einer Patientenprobe getestet werden, die bekannterweise HIT-positiv ist. Der passendste Spender wird in Probe IV (Patientenprobe mit physiologischer Heparinkonzentration) die höchste Aktivierung auslösen. Es ist außerdem wichtig, dieselben Plättchenspender mit einer Probe von Personen, die bekannterweise HIT-negativ sind, zu überprüfen.

Es ist wichtig, dass der Plättchenspender in den letzten 3 bis 4 Tagen vor der Blutentnahme keine Plättchenhemmer, wie Aspirin, oder entzündungshemmende Medikamente, wie Ibuprofen, Advil etc. eingenommen hat. Diese Wirkstoffe können zu einem Fehlschlagen des Tests führen, selbst wenn Reagens C noch seine Wirkung behält.

Aufbereitung des plättchenreichen Plasmas (PRP)

- Venenblut eines Blutspenders mit Blutgruppe 0 entnehmen und in ein leeres Röhrchen mit Citratlösung geben (zum Beispiel: 454382, Greiner Vacuette). Aseptische Venenpunktion verwenden.
- Das Blut durch vorsichtiges Umdrehen des Röhrchens mit dem Citrat vermischen. *Unnötige Bewegungen vermeiden.*
- Die Blutprobe sollte bei Zimmertemperatur (20 bis 25 °C) gelagert und unmittelbar nach der Entnahme verarbeitet werden.
- Das Blut 5 Minuten lang bei 100 g und niedriger Beschleunigung sowie deaktivierter Bremse rotieren lassen.
- Deckel abnehmen und die oben angesammelte, gelbe Flüssigkeit, bei der es sich um das PRP handelt, in ein leeres Röhrchen geben. Deutlich oberhalb der roten und weißen Thrombozytenpellets bleiben! Weiße und rote Blutkörperchen sind für diesen Test ungünstig.
- Das PRP innerhalb von 2 Stunden verwenden.

Verarbeitung einer frisch entnommenen Patientenprobe

- Mithilfe einer aseptischen Venenpunktion Venenblut des Patienten entnehmen und in ein Röhrchen ohne Zusatz (Serum) (zum Beispiel 454045, Greiner Vacuette) geben.
- Zur Gewinnung des Serums 30 Minuten zur Klumpenbildung ruhen lassen und das Röhrchen 20 Minuten bei 1000 g bei RT rotieren lassen.
- Deckel abnehmen und die oben angesammelte, gelbe Flüssigkeit (Serum) in ein leeres Röhrchen geben. *Deutlich oberhalb der roten und weißen Thrombozytenpellets bleiben. Klumpen nicht verwenden.*
- Die Serumprobe sollte bis zur Verwendung bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) gelagert werden.
- Die Serumprobe innerhalb von 12 Stunden nach Gewinnung verarbeiten. Serum kann bei -80 °C über längere Zeit gelagert werden.

Verarbeitung einer tiefgekühlten Patientenprobe

- Tiefgekühltes Patientenserum kann ebenfalls verwendet werden, zum Beispiel, wenn eine Probe an einem anderen Ort getestet werden soll. Es empfiehlt sich, nur Serum zu verwenden, das nur ein Mal tiefgekühlt wurde.
- Die Proben nach dem Auftauen auf Eis lagern.
- Die Proben vor der Verwendung bei Hochgeschwindigkeit (20 Minuten bei 1000 g) zentrifugieren *oder* durch einen Zentrifugalfilter mit 0,2 µm (zum Beispiel VWR 5160233) filtern, um Aggregate zu entfernen.

Testverfahren HITAlert™ Kit

Kein vorgewärmtes oder erhitztes (hitzeinaktiviertes) Patientenserum verwenden.

1. Reagens C in 200 µl 70 %-igem oder 96 %-igem Ethanol lösen. Das ist die Vorratslösung von Reagens C.
2. Die Vorratslösung von Reagens C in einem Vortex oder Überkopfmischer gründlich mischen.
3. Reagens C benötigt zur vollständigen Lösung in Ethanol 15 bis 30 Minuten. Das gelöste Material kann eine geringfügige Ausfällung aufweisen.
4. Diese Vorratslösung von Reagens C kann direkt für den Test verwendet werden. Die Phiole ordnungsgemäß markieren und die Vorratslösung von Reagens C nach Gebrauch bei -20 °C lagern, damit sie für die nächsten Tests mit diesem Kit zur Verfügung steht.

Inkubation der Proben

5. Es ist wichtig, die Schritte sorgfältig und in der richtigen Reihenfolge auszuführen. Abrupte Bewegungen schränken die Verlässlichkeit des Tests ein.
6. Den ersten Inkubationsschritt (Tabelle 1) in den 2,2-ml-Phiole, die im Kit enthalten sind, ausführen.
7. Der Test wird durchgeführt, indem die Reagenzien am Boden einer 2-ml-Phiole von links nach rechts einander zugegeben werden (*Bei jedem Pipettieren unbedingt eine neue Spitze verwenden*):

Test Proben	Reagens A	PRP	Patient Probe	Reagens B	Reagens G	Reagens C
I	35 µl	10 µl	---	5 µl	---	---
II	35 µl	10 µl	---	---	---	5 µl
III	30 µl	10 µl	10 µl	---	---	---
IV	25 µl	10 µl	10 µl	5 µl	---	---
V	25 µl	10 µl	10 µl	---	5 µl	---

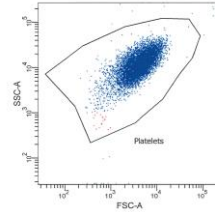
Tabelle 1. Zu vermischende Komponenten für die Inkubation der Probe.

- I: PRP mit Heparin
- II: PRP mit Calcium Ionophor
- III: PRP mit Patientenprobe
- IV: PRP mit Patientenprobe und Heparin
- V: PRP mit Patientenprobe und 100 U/ml Heparin

8. Suspension vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren vermischen. *Luftblasen vermeiden.*
9. Die Röhrchen bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) eine Stunde lang auf einem horizontalen Rundschüttler inkubieren. Der Schüttler muss schnell genug sein, um eine leichte Bewegung der Proben zu erzeugen. *Luftblasen vermeiden.*

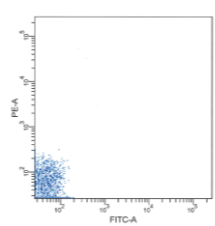
Färben der Proben

10. 5 Röhrchen (für Durchflusszytometrie geeignet) mit I, II, III, IV und V beschriften.
11. In einem neuen Röhrchen eine Mischung mit 210 µl Reagens D, 30 µl Reagens E und 30 µl Reagens F und gut mischen.
12. 45 µl dieser Mischung jedem Röhrchen aus Schritt 10 hinzufügen. Die Röhrchen im Dunkeln lagern, bis ein Teil der inkubierten Testprobe zugegeben werden kann.
13. Nach der einen Stunde Inkubationszeit (Schritt 9), 5 µl des Testprobengemischs dem entsprechenden Röhrchen mit der Färbelösung hinzufügen. Proben durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mischen. *Luftblasen vermeiden.* Die Mischung bei Raumtemperatur (20 bis 25 °C) 15 Minuten lang im Dunkeln inkubieren.
14. Jedem Röhrchen 400 µl Reagens D hinzufügen.
15. Die Zellen sind jetzt für die Erfassung und Auswertung per Durchflusszytometrie bereit. Die Erfassung bitte so schnell wie möglich und spätestens 30 Minuten nach Zugabe von Reagens D durchführen.



Zytogramm 1. SSC (vertikal) / FSC (horizontal) Dot-Plot und Analysefenster zur Auswahl der Plättchen.

Probe S1 wird auch für die Einstellung der Spannungen des FL-1- und FL-2-Photomultipliers (PMT) verwendet. Einen FL-1/FL-2-Dot-Plot erstellen und die Basissignale in der linken, unteren Ecke in einem FL-1 vs. FL-2 Dot-Plot festlegen (siehe Zytogramm 2).



Zytogramm 2. Korrekte Einstellung der PMT-Spannungen für FL-2 (vertikal) und FL-1 (horizontal) der ungefärbten Probe.

Datenerfassung

Einstellung des Durchflusszytometers

Für die Einstellung des Durchflusszytometers werden drei Röhrchen benötigt (Tabelle 2):

- Drei Röhrchen (für das Zytometer geeignet) mit S1, S2 und S3 beschriften.
- Die verschiedenen Komponenten entsprechend Tabelle 2 zu den Röhrchen hinzufügen. Unbedingt darauf achten, jedem Röhrchen 5 µl von Testprobe II hinzuzufügen.
- Die Röhrchen vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren mischen. Dabei Luftblasen vermeiden. 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubieren.
- Dem Röhrchen 400 µl Reagens D hinzufügen.
- Die Zellen können nun zur Einstellung des Durchflusszytometers benutzt werden.

3. Die Proben S2 und S3 werden zur Einstellung der Kompensation verwendet. Diese Kompensationseinstellungen zwischen den Fluoreszenzsignalen von FITC (FL-1) und R-PE (FL-2) sollten so optimiert werden, dass die stimulierten (FL-1-positiven) von den nicht stimulierten (FL-1-negativen) Plättchen korrekt getrennt werden.
 - a. Probe S2 zur Einstellung der Kompensation von R-PE (FL-2) im FITC-(FL-1)-Kanal (siehe Zytogramm 3) verwenden.
 - b. Probe S3 zur Einstellung der Kompensation von FITC (FL-1) im R-PE-(FL-2)-Kanal (siehe Zytogramm 4) verwenden.

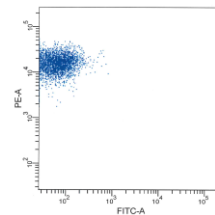
Röhrchen	Proben 5 µl	Reagens D	Reagens E	Reagens F
S1	II	45 µl	---	---
S2	II	40 µl	5 µl	---
S3	II	40 µl	---	5 µl

Tabelle 2. Komponenten, die für die Einstellung des Durchflusszytometers zu vermischen sind. Es werden Plättchen aus Testprobe II (Schritt 4) verwendet.

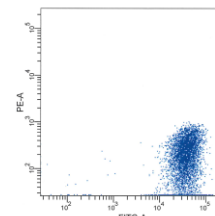
Analyse

1. Drei Dot-Plots erstellen, einen Dot-Plot zu Vorwärtsstreuung (FSC) vs. Seitwärtsstreuung (SSC) mit logarithmischer Skala zur Auswahl der Plättchen, einen Dot-Plot zu R-PE vs. SSC zur Auswahl der positiven Ereignisse der Plättchenmarker und einen Dot-Plot zu FITC vs. R-PE zur Bestimmung der Aktivierung der Plättchen.
2. Mit Röhrchen S1 die Spannung für den FSC-SSC einstellen.

Unter Verwendung eines Analysefensters alle Plättchen auswählen und Zelltrümmer und Hintergrundgeräusche durch Einstellen des richtigen FSC-Grenzwerts ausschließen (siehe Zytogramm 1). Das Gate auf der unteren, linken Seite *nicht* zu eng machen. Nach Aktivierung der Plättchen wird ein Teil der Plättchen kleiner (Mikrovesikel). Dieses Gate kann durch „Backgating“ des Aktivierungsmarkers und der positiven Zellen des Plättchenmarkers aus Schritt 5 überprüft werden. Das Analysefenster für den nächsten Schritt der Auswertung aktivieren.



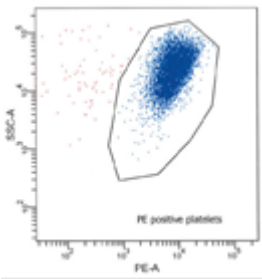
Zytogramm 3. Kompensation des R-PE-Signals (FL-2, vertikal) im FL-1-Kanal (horizontal).



Zytogramm 4. Kompensation des FITC-Signals (FL-1, horizontal) im FL-2-Kanal (vertikal).

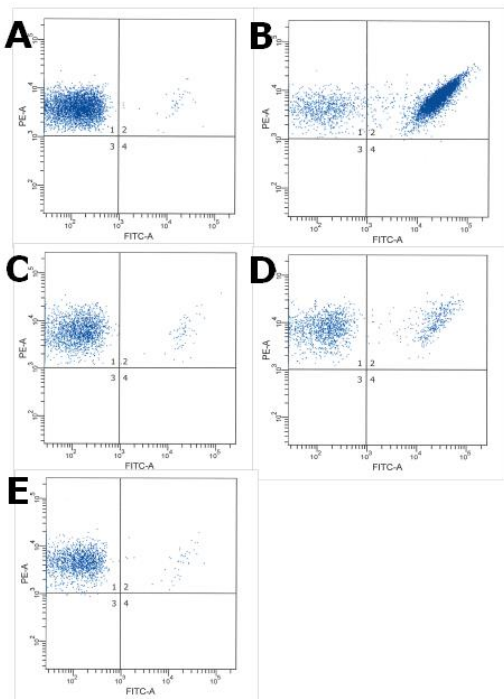
4. Nach der Auswahl der positiven Ereignisse der Plättchenmarker (FL-2) in einem SSC/FL-2-Dot-Plot können die Testproben schließlich nacheinander analysiert werden. Unbedingt auch die positiven Zwischenereignisse auswählen. Dabei handelt es sich um Plättchenpartikel, die nach der Aktivierung der Plättchen geformt werden.

Für beide fluorochrom-konjugierte Antikörper sollten mindestens 10.000 Ereignisse für log FSC, log SSC und log Fluoreszenzsignale mit einem Gate um die Region der Plättchenpartikel im Listenmodus erfasst werden. Bei Erfassung von weniger als 10.000 Ereignissen kann es zu Ungenauigkeiten im Test kommen.



Zytogramm 5. Auswahl von R-PE-positiven Plättchen im SSC-R-PE-Diagramm.

- Diese Auswertung erfolgt mithilfe eines Quadranten, der unmittelbar unter der positiven Population des Plättchenmarkers und unmittelbar rechts dieser Population positioniert wird (siehe Zytogramm 6 A, B, C, D und E). Die Prozentzahl der aktivierten Plättchen wird als Prozentzahl der Plättchenpopulation ausgedrückt. Unbedingt darauf achten, dass beide Analysefenster, sowohl aus Zytogramm 1 als auch aus Zytogramm 5, aktiviert sind.



Zytogramm 6. Typische Formen eines Sets Testproben eines mit dem HITAlert Kit positiv getesteten Patienten. Die Auswertung erfolgte mit einem BD FACSCanto II. **A.** Nicht stimulierte Probe (I.) **B.** Mit Ca-Ionophor stimulierte Probe (II.) **C.** Patientenprobe ohne Heparin (III.) **D.** Patientenprobe mit Heparin (IV.) und **E.** Patientenprobe mit einem Überschuss an Heparin (V.)

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Untersuchung von Blutproben von Patienten sind eine qualitative und verlässliche Quelle zur Bestimmung des Vorhandenseins von pathogenen Antikörpern in peripherem Blut, die für Heparin-Komplexe spezifisch sind.

Auswertung

	HIT-negativer Patient	Patient, der sehr wahrscheinlich HIT-positiv ist
Probe I	< 5 %	< 5 %
Probe II	80-100 %	80-100 %
Probe III	< 5 %	Aktivierung von (weniger als) der Hälfte von Probe IV
Probe IV	< 5 %	≥ 8 %
Probe V	< 5 %	Aktivierung von (weniger als) der Hälfte von Probe IV

Tabelle 3: Typische Ergebnisse eines HIT-negativen Patienten und eines HIT-positiven Patienten. Ein typisches Ergebnis eines HIT-positiven Patienten, das mit dem HITAlert™ Kit gewonnen wurde, ist in Zytogramm 6 D dargestellt. Bei der Probe IV können Zwischenaktivierungen im Bereich zwischen 5 und 8% beobachtet werden. Diese Patientenproben sollten erneut getestet werden (siehe Abschnitt „Proben III, IV und V“).

Probe I

Die nicht stimulierte Plättchenprobe (I.) sollte typischerweise weniger als 1 % Plättchen mit positiver Reaktion auf den Aktivierungsmarker aufweisen. Wenn diese Prozentzahl über 5 % liegt, sollte der Test wiederholt werden. Vorzugsweise dann mit dem PRP eines anderen Spenders.

Probe II

Die Plättchen der mit Ca-Ionophor stimulierten Probe (II.) sollten zu mehr als 80 % positiv auf den Aktivierungsmarker ansprechen. Ein Prozentsatz unter 80 % könnte dadurch verursacht worden sein, dass das Ca-Ionophor bei Gebrauch noch nicht vollständig gelöst war.

Proben III, IV und V

Probe IV, das PRP mit Heparin und Patientenprobe, sollte eine Aktivierung von $\geq 8\%$ aufweisen. Tabelle 4 zeigt die typischen Ergebnisse.

Samples III, IV and V

Typische Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt. Gemäß Tabelle 3 sollte ein Patient, der sehr wahrscheinlich positiv für HIT ist, in Probe IV eine Aktivierung von $\geq 8\%$ aufweisen, die das PRP mit Heparin und eine Patientenprobe umfasst. Ein Patient mit negativem HIT sollte in Probe IV eine Aktivierung von $<5\%$ haben. Gelegentlich wird in Probe IV eine Zwischenaktivierung (5-8%) beobachtet. Dieser Patient sollte nach Entnahme einer neuen Probe und vorzugsweise mit einem anderen PRP-Spender erneut getestet werden.

Es gibt Ausnahmen zu Tabelle 3:

Die Patientenprobe kann bereits Heparin-Antikörper-Komplexe aus dem Blutkreislauf des Patienten enthalten.

Die Anzahl der positiven Ereignisse des Aktivierungsmarkers in Probe IV ist $\geq 8\%$, aber es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen Probe III und IV. Probe V zeigt eine deutlich niedrigere Aktivierung als Probe IV (üblicherweise die Hälfte der Aktivierung oder weniger). Die Aktivierung der Plättchen ist in diesem Fall heparin-abhängig und das Ergebnis eine Indikation auf HIT. (Siehe auch Grenzen des Verfahrens)

Die Aktivierung ist heparin-unabhängig

Die Anzahl der positiven Ereignisse des Aktivierungsmarkers in Probe IV ist $\geq 8\%$, aber es gibt keinen „signifikanten“ Unterschied zwischen den Proben III, IV und V. Eine zusätzliche physiologische oder hohe Heparinkonzentration ergibt keine Veränderung in der Prozentzahl der aktivierten Plättchen. Die Aktivierung der Plättchen ist nicht heparin-abhängig und das Ergebnis in allen drei Proben annähernd gleich.

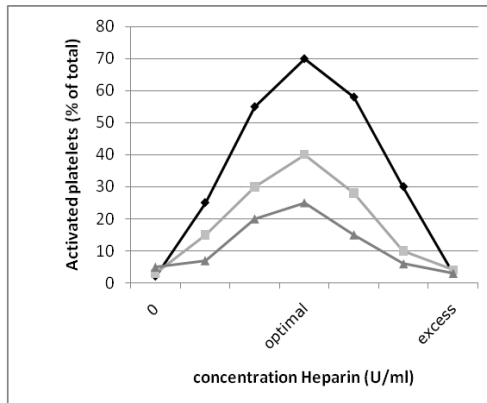


Abbildung 1: Typische Form für die Plättchenaktivierung bei verschiedenen Heparinkonzentrationen. Das Heparin in Reagens B (in Probe IV) wird der Probe in der optimalen Heparinkonzentration für die Aktivierung zugegeben. Das Heparin in Reagens G stellt die überschüssige Konzentration dar [Ref. 2]

Dieses HITAlert™ Kit sollte als Screening-Test verwendet werden. Die Ergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit den klinischen Befunden und anderen serologischen Tests verwendet werden.

Qualitätskontrolle

Alle Reagenzien des HITAlert™ Kit unterliegen Qualitätskontrollen.

Grenzen des Verfahrens

- Die Entnahme der Blutproben ist durch Personal sicherzustellen, das mit aseptischen Techniken Erfahrung hat.
- Die Mitarbeiter sollten zum Umgang mit einem Durchflusszytometer geschult werden und wissen, wie die Daten auszuwerten sind.
- Das HITAlert™ Kit ist zur Verwendung in Kombination mit einem Durchflusszytometer und *nicht* zur Verwendung mit einem Hämatologie-Analysegerät oder einem Immunfluoreszenz-Mikroskop bestimmt.
- Die Genauigkeit der Ergebnisse des Durchflusszytometers hängt von der korrekten Ausrichtung und Kalibrierung der Laser und Detektoren ab. Das Labor ist für die ordnungsgemäße Kalibrierung und Wartung verantwortlich.
- Es sollten regelmäßige Qualitätskontrollen entsprechend der Angaben in der Bedienungsanleitung des Herstellers zum Durchflusszytometer erfolgen.
- Dieser Test kann falsche positive Ergebnisse erzeugen, wenn PRP-Plasma von Spendern verwendet wird, die Phänotyp A, B oder AB positiv haben. Die Plättchen sollten von einem Spender mit Typ 0 stammen.
- Unzuverlässige Ergebnisse können bei Patienten erwartet werden, die (bekannterweise) eine HAMA-Antwort* zeigen oder Kälte- oder Autoagglutinine besitzen. In der klinischen Studie wurden nur Proben von Personen getestet, bei denen keine Koagulationskrankheiten, wie ITP oder andere, bekannt waren.
- Plättchenaggregation, Satellitenbildung und Autofluoreszenz bei roten Blutzellen können ebenfalls zu unzuverlässigen Ergebnissen führen.
- Hämolytisch, ikterisch, lipämisch (übermäßig) und bakteriell verseuchte Proben, Proben von Patienten mit einem Myelom sowie Kontrollen anderer Test-Kits wurden nicht getestet und können zu fehlerhaften Ergebnissen führen.
- Dieses HITAlert™ Kit sollte als Screening-Test verwendet werden. Die Ergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit den klinischen Befunden und anderen serologischen Tests verwendet werden.

* HAMA = Humane Anti-Maus-Antikörper

Leistungsmerkmale

Bindungsspezifität von Antikörpern

Der Antikörper, der in diesem Test verwendet wurde, wurde im HLDA-Workshop (Humane Leukozyten-Differenzierungs-Antigene) typisiert.

Klinische Bewertung

In der klinischen Studie wurde das HITAlert™ Kit mit einem für IVD zugelassenen PF4 IgG ELISA-Test (nach Herstelleranweisungen durchgeführt) in zwei Prüfzentren verglichen. Hier wird nur ein Teil der Studie vorgestellt. Insgesamt wurden 195 Proben mit Verdacht auf HIT getestet. Neben den ELISA-Daten, die bei allen Proben vorlagen, standen für einen Teil der Proben Daten zur endgültigen klinischen Diagnose (n=149) und zur Aggregation (n=44) zur Verfügung.

Bei einem Cut-off von 5% Aktivierung beträgt die Sensitivität 78% (95% Konfidenzintervall 40% - 97%) und die Spezifität 87% (95% Konfidenzintervall 77% - 94%).

Die Receiver Operating Characteristic Curve (ROC-Kurve) gehört zur guten Praxis und vergleicht einen diagnostischen Test, hier das HITAlert™ Kit mit der bekannten klinischen Diagnose der Proben.

Die ROC-Kurve zeigt den Ausgleich zwischen Sensitivität (Fähigkeit, die Krankheit zu erkennen) und Spezifität (Fähigkeit, das Fehlen einer Krankheit zu erkennen). Um die ROC-Kurve zu zeichnen, mussten die Daten aufgeteilt werden: in keine HIT, geringes Risiko für HIT, moderates Risiko für HIT und positiv diagnostizierte HIT.

Die ROC-Kurve hat gezeigt, dass die beste Trenngrenze zwischen positiven und negativen Proben bei einer Aktivierung von 8 % möglich ist. Auf diesem Niveau liegt die Sensitivität des Tests bei der Unterscheidung zwischen KEINE HIT und der Diagnose mit HIT bei 78 % (95 % Konfidenzintervall 40 % - 97 %) und die Spezifität bei 98 % (95 % Konfidenzintervall 91 % - 100 %). Dieselbe 8 %-Grenze wurde in der Kombination der Proben mit geringem und moderatem Risiko des 4T-Scores im Vergleich mit HIT-positiven Proben festgestellt. Diese 8%-Grenze deckt sich mit der Veröffentlichung von Tomer et al. (2), die zu einer Trenngrenze bei 6,6 % bei einer begrenzten Anzahl von Proben kommen. In dieser Arbeit wird beim Vergleich der Durchflussmethode mit dem SRA eine Sensitivität von 95 % und eine Spezifität von 100 % gezeigt.

Die ROC-Kurven vom Vergleich des HITAlert™ Kit mit den Flächen KEIN HIT („gesunde“ Fläche unter der Kurve 0,906 (95 % Konfidenzintervall 0,790 - 1,023)), geringes Risiko (Fläche unter der Kurve 0,884 (95 % Konfidenzintervall 0,774 - 0,994)) und moderates Risiko (Fläche unter der Kurve 0,790 (95 % Konfidenzintervall 0,610 - 0,970)) sind in Abbildung 2 eingezeichnet. Aus den jeweiligen Kurven geht hervor, dass der Test die HIT-Fälle von den negativen Fällen und den Fällen mit geringem und moderatem Risiko unterscheidet.

Es kann geschlossen werden, dass das HITAlert™ Kit die Patienten mit dem höchsten 4T-Score korrekt identifiziert.

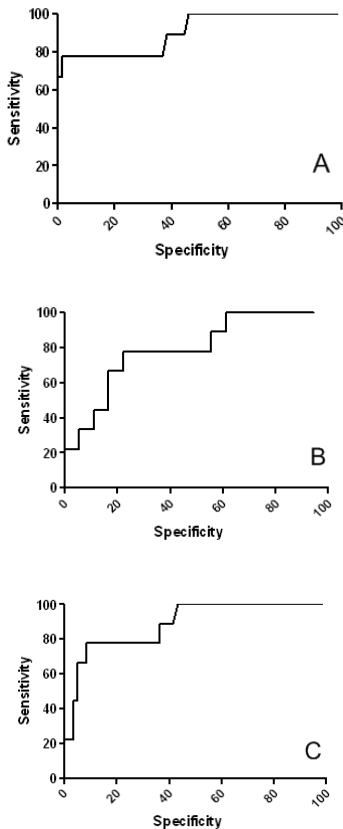


Abbildung 2. ROC-Kurven der Daten des HITAlert™ Kit von Patienten mit positiver HIT-Diagnose gegenüber Patienten mit negativer HIT-Diagnose (A), gegenüber Patienten mit der Diagnose eines moderaten HIT-Risikos (B) und gegenüber Patienten mit einem geringem HIT-Risiko (C) (Definition nach dem klinischen 4T-Score). Die Flächen unter der Kurve sind jeweils 0,906 (95 % Konfidenzintervall 0,790 - 1,023) , 0,790 (95 % Konfidenzintervall 0,610 - 0,970) und 0,884 (95 % Konfidenzintervall 0,774 - 0,994).

Literatur

- Warkentin TE und Heddle NM. Laboratory Diagnosis of Immune Heparin-induced Thrombocytopenia. *Current Hematology Reports*, 2003;2:148-157.
- Tomer, A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1997 Sep;98(3):648-56.
- Tomer A, Masalunga C und Abshire TC. Determination of heparin-induced thrombocytopenia: a rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody-mediated platelet activation. *Am J Hematol*. 1999 Mai;61(1):53-61.
- Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K, Eichler P und Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes. *J Thromb Haemost*. 2007; 5; 1666.
- Tomer A. Sensitivity and specificity of laboratory tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Laboratory Hematology*. 1997;3:174-5.
- Warkentin TE, Sheppard JI, Raschke R und Greinacher A. Performance characteristics of a rapid assay for anti-PF4/heparin antibodies: the particle immunofiltration assay. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2308-10.
- NEN EN ISO 15223-1 Medizinprodukte - Bei Aufschriften von Medizinprodukten zu verwendende Symbole, Kennzeichnung und zu liefernde Informationen - Teil 1: Allgemeine Anforderungen.

Garantie

Für die hier beschriebenen Produkte wird nur eine Garantie über die auf der Packung angegebene Anzahl und den Inhalt zum Zeitpunkt der Lieferung an den Kunden gegeben. Es werden keine Gewährleistungen gegeben, weder implizit noch ausdrücklich, die über die Beschreibung auf dem Produktetikett hinausgehen. IQ Products bv haftet nicht für Sach- und Personenschäden oder wirtschaftliche Verluste, die durch das Produkt entstanden sind.

Charakterisierung

Um eine gleichbleibend hohe Qualität der Reagenzien zu gewährleisten, wurde jede Charge monoklonaler Antikörper auf Übereinstimmung mit den Eigenschaften eines normgerechten Reagens getestet.

Vacurette® ist eine registrierte Handelsmarke von Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
www.vacurette.gbo.com

Symbolerklärung

	Gebrauchsanweisung beachten
	Katalognummer
	Reicht für
	In-vitro-Diagnostikum
	Vorsicht, Packungsbeilage beachten
	Vor (Sonnen-)Licht schützen
	Biogefährdung
	Temperaturbegrenzung (°C)
	Nur für Forschungszwecke
	Chargennummer
	Verwendbar bis JJJJ-MM-TT
	NIHersteller
	Bevollmächtigter Repräsentant für die Europäische Gemeinschaft
	Europäische Konformität ((European Conformity))

Kontakt


www.iqproducts.nl

Rozenburglaan 13a
9727 DL Groningen
Die Niederlande
Tel.: +31 (0)50 5757000
Fax: +31 (0)50 5757002
marketing@iqproducts.nl

Dieses Produkt ist in allen Ländern der Europäischen Union zur In-Vitro-Diagnostik zugelassen. Für alle anderen Ländern ist dieses Produkt nur für Forschungszwecke bestimmt.

©2019 - IQ Products bv. Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil dieser Dokumente darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Genehmigung wiedergegeben werden.

HITAlert™ Kit

REF⁷ IQP-396 ▽ 30 tests

 Consultare le Istruzioni per l'uso

IVD **CE** Dispositivo medico-diagnostico in vitro

Questo prodotto è protetto da US patent 5,763,201. IQ Products è il licenziatario esclusivo di questo brevetto.

Utilizzo

HITAlert™ Kit è utilizzato per la determinazione degli anticorpi del complesso dell'eparina, che sono la causa di attivazione dei trombociti (piastrine) e possono condurre allo sviluppo di eparina immune che causa trombocitopenia.

Principio del test

La trombocitopenia indotta da eparina (HIT) è una sindrome distinta, la cui diagnosi degli anticorpi patogeni della HIT è molto utile nei laboratori. Questo test di attivazione piastrinica che individua gli anticorpi basati sulle loro caratteristiche di proprietà dell'attivazione piastrinica, è differente dai test di antigene che misura gli anticorpi reattivi al fattore 4(PF4) piastrinico – complesso eparinico o PF4 – complesso polianionico. Parte degli anticorpi patogenici possono essere specifici per i complessi eparinici basati sull'eparina e l'interleuchina 8 o sull'eparina e peptide 2 attivante i neutrofili. Il kit HITAlert™ Kit mostra anticorpi che riconoscono i complessi dell'eparina dipendenti della seconda molecola e mostra solo quegli anticorpi capaci di indurre attivazione delle piastrine. Gli anticorpi che si legano al complesso sono capaci di legarsi al recettore FcγII sulle piastrine e sulle piastrine attivate.

Sono utilizzati per HITAlert™ Kit donatori di piastrine (PRP), che sono incubate in presenza del siero del paziente e in presenza o assenza di eparina. Quando anticorpi patogenici sono presenti l'attivazione delle piastrine del donatore sono mostrate utilizzando un marcatore di attivazione piastrinica. Incubando i campioni con un anticorpo contro le piastrine e con un marcatore di attivazione possono essere visualizzati utilizzando la citofluorimetria. Per la valutazione dei campioni marcati sono necessari un citofluorimetro standard capace di leggere la fluorescenza 1 (FITC) e la fluorescenza 2 (R-PE).

Questo HITAlert™ Kit test dovrebbe essere sempre usato come test di screening. I risultati dovrebbero essere utilizzati in concomitanza con riscontri clinici o altri tests serologici.

Per ogni paziente sospettato di HIT viene valutato un set di campioni

- I. Un campione di PRP con eparina; per mostrare il background di attivazione dovuto alla manipolazione e per escludere che il donatore di PRP sia HIT positivo.
- II. Un campione di PRP con Ca-ionoforo; per aver attivato i trombociti che possono essere usati per settare il citofluorimetro.
- III. Un campione di PRP con il siero del paziente; per mostrare il 'background' di attivazione dovuto al siero.
- IV. Un campione del donatore di PRP con il siero del paziente ed eparina a concentrazione fisiologica; per mostrare l'attivazione dovuta alla presenza del complesso di eparina legante anticorpi.
- V. Un campione del donatore di PRP con il siero del paziente e un eccesso di eparina; questo campione dovrebbe mostrare un decremento nell'attivazione piastrinica in caso di un campione positivo IV, poiché i complessi immuni sono distrutti a causa dell'alta concentrazione di eparina.

Si suggerisce di includere un campione di solo PRP quando il test viene introdotto negli standard di laboratorio per controllare il background di attivazione dovuto alla manipolazione.

E' consigliabile sempre includere un campione di un paziente conosciuto per positività HIT II (materiale NON fornito).

HITAlert™ Kit contiene

Reagente A	Tampone per il test	5 ml
Reagente B	Eparina	150 µl
Reagente C	Platelet Activator (Ca-Ionoforo)	1 vial
Reagente D	Tampone per la colorazione	20 ml
Reagente E	Marcatore per piastrine (Anticorpo Monoclonale)	200 µl
Reagente F	Marcatore per attivazione piastrinica (Proteina ricombinante)	200 µl
Reagente G	Eparina 1000 U/ml	150 µl
2.2 ml PP provette utilizzate per l'incubazione del campione		30

Ogni kit contiene reagenti sufficienti per testare 6 pazienti (30 tests).

Materiale di laboratorio richiesto ma non incluso

- Citofluorimetro
- Provette per raccolta sangue con citrato; es. provette Greiner Vacuette 454382;
- Provette per citofluorimetro;
- Centrifuga da laboratorio;
- Micropipette regolabili e puntali;
- Etanolo al 70% o 96%
- Agitatore (es. agitatore per piastre ELISA o agitatore per piastrine)

Conservazione

Il kit va conservato a 2 - 8 °C. Evitare l'esposizione alla luce diretta. I reagenti conservati rispettando le istruzioni contenute, sono stabili fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Per test ripetuti conservare il reagente subito dopo l'uso a 2 - 8 °C e il reagente C dissolto a -20 °C.

Avvertimenti e precauzioni

I reagenti contenenti Sodio Azide potrebbero reagire con le tubature di piombo o rame e formare azidi metalliche esplosive. Nei tubi di scarico fare scorrere abbondante acqua per evitare la formazione di azidi. Tutti i reagenti dovrebbero essere trattati secondo le buone regole di laboratorio utilizzando le appropriate precauzioni. Inoltre maneggiare tutti i campioni dei pazienti con le dovute precauzioni. Non pipettare con la bocca e indossare i guanti durante la metodica.

Sostituzione di altri componenti con quelli forniti nel kit potrebbero portare a inconsistenti o erronei risultati.

Il test dovrebbe essere eseguito da tecnici di laboratorio autorizzati e ben istruiti. Pregasi contattare il produttore se il test nel kit originario è danneggiato.

Caratteristiche strumentali richieste

- Assicurarsi che il citofluorimetro sia calibrato correttamente seguendo le istruzioni del produttore.
- Si consiglia di attuare la calibrazione strumentale e mantenerla in modo regolare.
- Il citofluorimetro dovrebbe essere adoperato da personale esperto. La valutazione dei risultati dovrebbe essere fatta da personale esperto nell'interpretazione dei dati citometrici

Raccolta campione e preparazione

Plasma arricchito di piastrine (PRP, Platelet Rich Plasma)

Non tutti i donatori di piastrine hanno piastrine adatte per ottenere PRP da utilizzare per saggi funzionali. Testare il PRP di diversi donatori con un campione del paziente con positività nota per HIT (trombocitopenia da eparina). Il donatore più appropriato produrrà la massima attivazione nel campione IV (campione del paziente con concentrazione di eparina in soluzione fisiologica). È anche importante testare gli stessi donatori di piastrine con un campione di individui negativi alla HIT.

È importante che il donatore di piastrine non abbia fatto uso di inibitori piastrinici come l'aspirina o di farmaci antinfiammatori come Ibuprofene, Advil e altri negli ultimi 3 o 4 giorni precedenti al prelievo di sangue. Questi agenti possono influire negativamente sull'esito dell'analisi, anche se il reagente C può continuare a funzionare bene.

Preparazione di plasma ricco di piastrine (PRP)

- Raccogliere il sangue venoso di un donatore di sangue 0 in una provetta di coagulazione con citrato di sodio (ad esempio: 454382, Greiner Vacuette), utilizzando la venopuntura asettica.
- Mescolare il sangue con il citrato una volta invertendo delicatamente il tubo. Prevenire l'agitazione non necessaria.
- Il campione di sangue deve essere conservato a temperatura ambiente (da 20 a 25 °C) e processato direttamente dopo il prelievo.
- Gira il sangue 5 minuti a 100g con bassa accelerazione e frena.
- Rimuovere il tappo e raccogliere il fluido giallo superiore, questo è il PRP, in una provetta vuota. Rimani ben al di sopra del pellet dei globuli rossi e bianchi! WBC e RBC sono scomodi nel test.
- Utilizzare il PRP entro 2 ore.

Processazione di un campione fresco del paziente

- Raccogliere il sangue venoso del paziente in una provetta da prelievo senza additivo (serum) (per esempio: 454045, Greiner Vacuette), utilizzando prelievo asettico.
- Per collezionare il siero, lasciare riposare 30 minuti affinché si formi il coagulo e centrifugare la provetta per 20 minuti a 1000g a RT.
- Rimuovere il tappo e raccogliere in una provetta vuota il fluido surnatante giallo (siero). Rimanere bene al di sopra del pellet di cellule rosse e bianche e ben lontano dal coagulo.
- Il campione di siero dovrebbe essere conservato a temperatura ambiente (20 - 25 °C) fino alla processazione.
- La processazione del siero deve essere fatta entro le 12 ore dal prelievo. Il siero può essere conservato per un periodo più lungo a -80 °C.

Processazione di un campione congelato del paziente

- Il siero congelato del paziente può essere usato, ad esempio, anche quando il campione deve essere testato in un posto diverso. Si consiglia di utilizzare il siero che è stato congelato una sola volta.
- Conservare i campioni in ghiaccio dopo scongelamento.
- Prima dell'uso centrifugare i campioni ad alta velocità per rimuovere gli aggregati o filtrarli con un filtro per centrifuga da 0.2 µm (per esempio VWR 516-0233).

Procedura del test HITAlert™ Kit

Non usare siero del paziente preriscaldato o riscaldato (inattivato dal calore).

1. Dissolvere il reagente C in 200 µl di etanolo al 70% o 96%. Si tratta della soluzione madre con reagente C.
2. Miscelare bene la soluzione madre con reagente C agitando su vortex o per inversione.
3. Per dissolvere completamente il reagente C nell'etanolo sono necessari dai 15 ai 30 minuti. Il materiale dissolto potrebbe presentare una lieve precipitazione.
4. Questa soluzione madre con reagente C può essere usata direttamente per l'analisi. Contrassegnare la fiala in modo appropriato e conservare la soluzione madre con reagente C a -20 °C, in modo da poterla utilizzare ancora per le analisi successive con lo stesso kit.

Incubazione campione

5. È importante che i passaggi siano eseguiti nel giusto ordine e con cura. Brusche agitazioni decremteranno la fattibilità dell'esperimento.
6. Eseguire il primo passaggio di incubazione (tavola 1) nelle provette da 2.2 ml incluse nel kit.
7. Eseguire l'analisi mettendo insieme i reagenti da sinistra a destra sul fondo di una provetta da 2 ml (Assicurarsi di utilizzare un nuovo puntale per ogni passaggio di pipettamento):

Provetta	Reagente A					
	PRP	campione del paziente	Reagente B	Reagente G	Reagente C	
I	35 µl	10 µl	---	5 µl	---	---
II	35 µl	10 µl	---	---	---	5 µl
III	30 µl	10 µl	10 µl	---	---	---
IV	25 µl	10 µl	10 µl	5 µl	---	---
V	25 µl	10 µl	10 µl	---	5 µl	---

Tavola 1. Componenti da aggiungere insieme per l'incubazione del campione.

- I: PRP con eparina
 II: PRP con ionoforo del Calcio
 III: PRP con campione del paziente
 IV: PRP con campione del paziente ed eparina
 V: PRP con campione del paziente e 100 U/ml di eparina.

8. Miscelare la sospensione attentamente pipettando su e giù. Evitare di generare bolle d'aria.
9. Incubare le provette da 20 a 25 °C su un agitatore orbitale orizzontale per un'ora. La velocità dell'agitatore deve essere abbastanza veloce da consentire un leggero movimento dei campioni. Evitare la generazione di bolle d'aria.

Colorazione dei campioni

10. Preparare 5 provette (idonee per il citofluorimetro) etichettandole con I, II, III, IV e V.
11. Preparare in una nuova provetta una miscela composta da 210 µl di reagente D, 30 µl di reagente E e 30 µl di reagente F e miscelare bene.
12. Aggiungere 45 µl di questa miscela a ognuna delle provette preparate al punto 10. Conservare le provette al buio fino a quando una parte del campione test incubato può essere aggiunto.
13. Dopo un'ora di incubazione (passaggio 9) aggiungere 5 µl di miscela del test campione alla provetta corrispondente con la soluzione di colorazione. Miscelare i campioni pipettando su e giù con attenzione. Evitare la formazione di bolle d'aria. Incubare la miscela per 15 minuti al buio a temperatura ambiente (20 - 25 °C).
14. Aggiungere 400 µl di reagente D alla provetta.
15. Le cellule sono ora pronte per l'acquisizione e la valutazione al citofluorimetro. Procedere con l'acquisizione dei dati non appena possibile e comunque non oltre i 30 minuti dall'aggiunta del reagente D.

Raccolta dei dati

Regolazione del citometro a flusso

Per aggiustare il setting strumentale del citofluorimetro si utilizzano 3 provette (tavola 2).

- Etichettare 3 tubi per citofluorimetro con S1, S2 and S3.
- Aggiungere nelle provette i differenti componenti seguendo la tabella 3. Aggiungere 5 µl del campione da testare II alla provetta.
- Agitare attentamente la provetta tappando l'estremità. Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente.
- Aggiungere 400 µl di reagente D ad ogni provetta.
- Le cellule sono ora pronte da utilizzare per la messa a punto del citometro

Provetta	Campioni (5 µl)	Reagente D	Reagente E	Reagente F
S1	II	45 µl	---	---
S2	II	40 µl	5 µl	---
S3	II	40 µl	---	5 µl

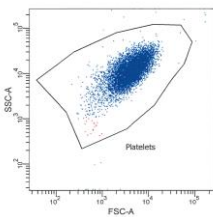
Tavola 2. Componenti da aggiungere insieme per l'aggiustamento del setting del citofluorimetro. Le piastrine sono utilizzate dal campione II del test (passaggio 4).

Analisi

6. Creare tre dot-plot, uno Forward Scatter FSC vs. Sideward Scatter (SSC) in scala logaritmica per selezionare le piastrine, uno R-PE vs. SSC per selezionare gli eventi positivi per la marcatura delle piastrine e uno FITC vs. R-PE per determinare l'attivazione delle piastrine.

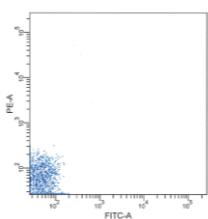
7. Aggiustare il voltaggio del setting per FSC-SSC utilizzando la provetta S1.

Selezionare tutte le piastrine utilizzando una regione ed escludere i detriti e il rumore di fondo selezionando un'appropriata soglia sul parametro FSC (vedi Citogramma 1). Disegnare un gate *non troppo* stretto nel quadrante inferiore sinistro. Dopo l'attivazione delle piastrine, la dimensione di parte delle piastrine risulterà ridotta (microvescicole). Questo gate può essere controllato utilizzando il backgating delle cellule positive per il marcatore di attivazione e il marcatore delle piastrine di cui al punto 5. Attivare la regione per il passaggio successivo della valutazione.



Citogramma 1. SSC (verticale) / FSC (orizzontale) e regione per selezionare le piastrine.

Il campione S1 è anche usato per aggiustare i voltaggi dei fotomoltiplicatori (PMT) di FL-1 e FL-2. Creare un dot-plot di FL-1/FL-2 e impostare i segnali di base FL1/FL2 nel quadrante inferiore sinistro di un dot-plot FL-1 vs. FL2 (vedere il citogramma 2).

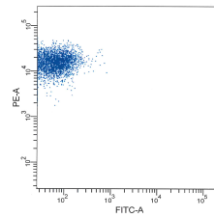


Citogramma 2. Aggiustamento corretto dei voltaggi di PMT per FL-1 (orizzontale) e FL-2 (verticale) del campione non colorato.

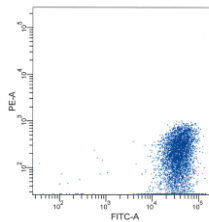
Selezione di piastrine non colorate (R-PE-negative) nel dot plot SSC - R-PE.

Aggiustamento corretto dei voltaggi di PMT per FL-1 e FL-2 del campione non colorato.

8. I campioni S2 e S3 sono utilizzati per aggiustare la compensazione. Questi setting di compensazione fra i segnali di fluorescenza FITC (FL-1) e R-PE (FL-2) dovrebbe essere ottimizzata per separare correttamente le piastrine stimolate (FL-1 positive) dalle non stimolate (FL-1 negative).
- utilizzare il campione S2 per aggiustare la compensazione di R-PE (FL-2) dal canale FITC (FL-1) (vedi Citogramma 3).
 - utilizzare campione S3 per aggiustare la compensazione di FITC (FL-1) dal canale R-PE (FL-2) (vedi Citogramma 4).



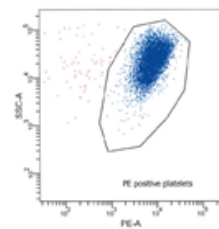
Citogramma 3. Compensazione del segnale di R-PE (FL-2, verticale) dal canale di FL-1 (orizzontale).



Citogramma 4. Compensazione del segnale di FITC (FL-1, orizzontale) dal canale della FL-2 (verticale).

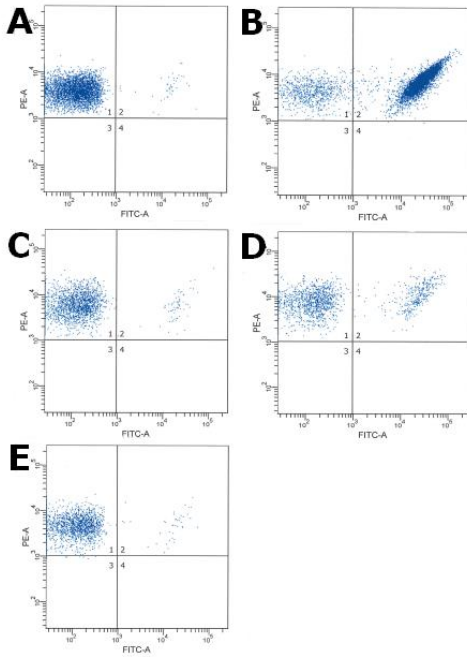
9. Finalmente i campioni del test possono essere analizzati uno per uno. Poiché i campioni del test sono tutti colorati con il marcatore per le piastrine essi sono positivi per R-PE nel dot plot R-PE-SSC.

Devono essere raccolti dati in modalità elenco di almeno 10.000 eventi per i parametri FSC, SSC e segnali di fluorescenza per entrambi gli anticorpi coniugati con fluorocromi, con la regione chiusa agli piastrine. Meno di 10.000 eventi influiranno sulla precisione dell'analisi.



Citogramma 5. Selezione di piastrine R-PE-positive nel dot plot SSC - R-PE.

10. La valutazione è fatta con l'utilizzo di un quadrante, che è settato appena sotto il marcatore per la popolazione delle piastrine positive e appena a destra di questa popolazione (vedi citogramma 6 A, B, C, D e E). La percentuale di piastrine attivate è espressa come percentuale della popolazione piastrinica. Accertarsi che entrambe le regioni, quella del citogramma 1 e quella del citogramma 5, siano attive.



Citogramma 6. Tipiche figure di un set di campioni di un paziente positivo valutato con il kit HITAlert e acquisito con BD FACSCanto

- A.** campione non stimolato (I.)
- B.** Campione stimolato con Ca-ionoforo (II.)
- C.** Campione di paziente senza eparina (III.)
- D.** Campione di paziente con eparina (IV.)
- E.** Campione del paziente con eccesso di eparina (V.)

Risultati

I risultati della valutazione dei campioni di sangue del paziente sono una fonte qualitativa e reale per determinare la presenza di anticorpi patogeni del complesso di eparina nel sangue periferico.

Interpretazione

	Paziente negativo per HIT	Paziente molto vicino ad essere positive per HIT
Campione I	< 5%	< 5%
Campione II	80-100%	80-100%
Campione III	<5%	attivazione (meno che) metà del campione IV
Campione IV	<5%	>= 8%
Campione V	<5%	attivazione (meno che) metà del campione IV

Tavola 3: risultati tipici per un paziente negativo per HIT e un paziente positivo per HIT. Un tipico risultato per un paziente positivo per HIT ottenuto con il kit HITAlert è mostrato nel citogramma 6 D. Per il campione IV si possono osservare attivazioni intermedie tra il 5 e l'8%, questi campioni di pazienti devono essere nuovamente testati (vedere il paragrafo "Esempi III, IV e V")

Campione I

Un tipico risultato ottenuto con il test HITAlert è mostrato nella figura sopra.

Campione (I) sono le piastrine non stimolate, tipicamente dovrebbe avere meno dell' 1% positivo del marker di attivazione piastrinica.

Quando questa percentuale è più alta del 5% il test dovrebbe essere ripetuto di nuovo. Preferibilmente con PRP di donatori diversi.

Campione II

Campione stimolato con Ca-ionoforo (II) tipicamente dovrebbe avere più dell' 80% del marker di attivazione piastrinica positivo.

Quando questa percentuale è più bassa 80%, può essere dovuto al fatto che il Ca-ionoforo non era ancora completamente dissolto quando è stato usato.

Campione III, IV, e V

Risultati tipici sono mostrati in tavola 3. Secondo la tabella 3, un paziente molto probabile che sia positivo per HIT dovrebbe avere un'attivazione >= 8% nel campione IV, comprendente il PRP con eparina e campione del paziente. Mentre un paziente negativo per HIT dovrebbe avere un'attivazione <5% nel campione IV. Occasionalmente si osserva un'attivazione intermedia (5-8%) nel campione IV, questo paziente deve essere nuovamente testato dopo aver estratto un nuovo campione e preferibilmente con un donatore PRP diverso.

Figura 1: una figura tipica per attivazione piastrinica a differenti concentrazioni di eparina. L'eparina nel reagente B (nel campione IV) è aggiunta al campione nella concentrazione ottimale di eparina per l'attivazione. L'eparina nel Reagente G è rappresentativa della concentrazione eccessiva. [ref 2]

Ci sono delle eccezioni per la tavola 3:

Il campione del paziente potrebbe già contenere i complessi anticorpo-eparina derivanti dalla circolazione del paziente. Il numero di eventi di marcatori positivi di attivazione nel campione IV è >= 8%, ma non c'è una significativa differenza tra campione III e IV. Il campione V mostrerà un'attivazione che è significativamente più bassa (tipicamente metà attivazione o più bassa) che nel campione IV. L'attivazione delle piastrine è eparina dipendente in quel caso e il risultato è indicativo per HIT. (Vedi anche limitazioni della procedura.)

L'attivazione è eparina indipendente

Il numero di eventi di marcatori positivi di attivazione nel campione IV è >= 8%, ma non c'è significativa differenza tra i campioni III, IV e V. L'aggiunta fisiologica o alta concentrazione di eparina non influenza la percentuale di piastrine attivate; l'attivazione delle piastrine non è eparina dipendente e generalmente è lo stesso in tutti e tre i campioni.

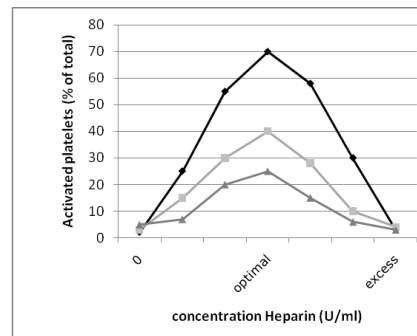


Figura 1: una figura tipica per attivazione piastrinica a differenti concentrazioni di eparina. L'eparina nel reagente B (nel campione IV) è aggiunta al campione nella concentrazione ottimale di eparina per l'attivazione. L'eparina nel Reagente G è rappresentativa della concentrazione eccessiva. [ref 2]

Questo test HITAlert™ dovrebbe essere usato come test di screening. I risultati dovrebbero essere usati in concomitanza di valutazioni cliniche o altri tests serologici.

Controllo qualità

Tutti i reagenti contenuti nel kit HITAlert sono sottoposti a controllo di qualità.

Limitazioni della procedura

- Personale esperto nelle tecniche asettiche di prelievo dovrebbe essere coinvolto per la raccolta dei campioni di sangue.
- Personale dovrebbe essere istruito nell'utilizzo del citofluorimetro ed avere esperienza nell'interpretazione dei dati.
- Il kit HITAlert è fatto per essere utilizzato in citometria a flusso e non per essere utilizzato su analizzatori ematologici o in microscopia a fluorescenza.
- Accurati risultati in citometria a flusso dipendono dal corretto allineamento e calibrazione dei laser e dei fotomoltiplicatori. Il laboratorio dovrebbe rispettare le corrette procedure di calibrazione.
- Le Procedure di Controllo Qualità dovrebbero essere eseguite regolarmente come indicate nel manuale dell'operatore fornito con il citofluorimetro.
- Questo test dovrebbe dare risultati falsi positivi quando il plasma PRP utilizzato proviene da donatori che hanno un fenotipo A, B o AB positivo. Le piastrine dovrebbero essere fornite da un donatore 0.
- Risultati non realizzabili si sono trovati con pazienti che avevano una risposta HAMA* o avevano raffreddore o autoagglutinine. Nello studio clinico sono stati testati campioni di persone senza fattori di coagulazione correlati a malattie quali ITP e altre.
- Aggregazione piastrinica e cellule rosse del sangue autofluorescenti potrebbero portare a risultati non leggibili
- Ittero emolitico, lipemia (di eccessiva natura), campioni batteriologicamente contaminati, campioni da pazienti con mieloma o controlli da altri test di kit che non sono stati testati possono produrre erronei risultati.
- Questo test HITAlert dovrebbe essere utilizzato come test di screening. I risultati dovrebbero essere utilizzati in concomitanza con sospetti clinici o altri tests serologici.

* HAMA= Human Anti Mouse Antibody

Caratteristiche di esecuzione

Specificità del legame dell'anticorpo

L'anticorpo utilizzato in questo test è stato tipizzato nel Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshop.

Valutazione clinica

Durante lo studio clinico HITAlert è stato comparato al test IVD approvato per PF4 IgG ELISA (utilizzato seguendo le istruzioni del produttore) ai due siti di studio. Solo parte dello studio è qui rappresentata. In totale 195 campioni sospetti per HIT sono stati testati. Oltre ai dati ELISA, conosciuti per tutti i campioni, la diagnosi clinica finale (n=149) e aggregazione (n=44) i dati erano disponibili per una parte dei campioni.

La curva Receiver Operating Characteristic (ROC) è una buona pratica per comparare gli esami diagnostici, in questo caso HITAlert, con le diagnosi cliniche conosciute dei campioni.

La curva ROC mostra il compromesso tra la sensibilità (abilità nel determinare la malattia) e la specificità (abilità nel determinare la mancanza di malattia).

Per disegnare le curve di ROC i dati devono essere scissi in no HIT, basso rischio di HIT, rischio intermedio di HIT e diagnosi positiva di HIT.

La curva Receiver Operating Characteristic (ROC) indica che il migliore cut off tra campioni positivi e negativi è 8% di attivazione. A questo livello la sensibilità dell'esame per discriminare tra NO HIT e la diagnosi di HIT è 78% (95% intervallo di confidenza 40% - 97%) e la specificità è 98% (95% intervallo di confidenza 91% - 100%). Lo stesso cut-off di 8% è stato trovato nella combinazione dei campioni con basso e medio rischio 4T numerosi comparati alla HIT.

Questo 8% cut-off è in linea con la pubblicazione di Tomer et al (2) risultante in un cut-off di 6.6% su un numero limitato di campioni. Lo stesso foglio mostra una sensibilità del 95% e una specificità del 100% quando la metodica citofluorimetrica è comparata alla SRA.

A una soglia di attivazione del 5% la sensibilità è del 78% (95 % intervallo di confidenza al 40% - 97%) e la specificità è del 87% (95% intervallo di confidenza al 77% - 94%).

Le curve ROC per la comparazione del HITAlert contro NO HIT ('sano'; l'area sotto la curva 0.906 (95% intervallo di confidenza 0.790 - 1.023)), bassa probabilità (area sotto la curva 0.884 (95% intervallo di confidenza 0.774 - 0.994) e probabilità intermedia (area sotto la curva 0.790 (95% intervallo di confidenza 0.610 - 0.970)) sono tracciate in figura 2. Da curve retrospettive è chiaro che il test discrimina i casi di HIT dai negativi, e i casi di basso rischio e intermedio.

Si può concludere che HITAlert identificherà positivamente i pazienti con la più alta numerazione 4T.

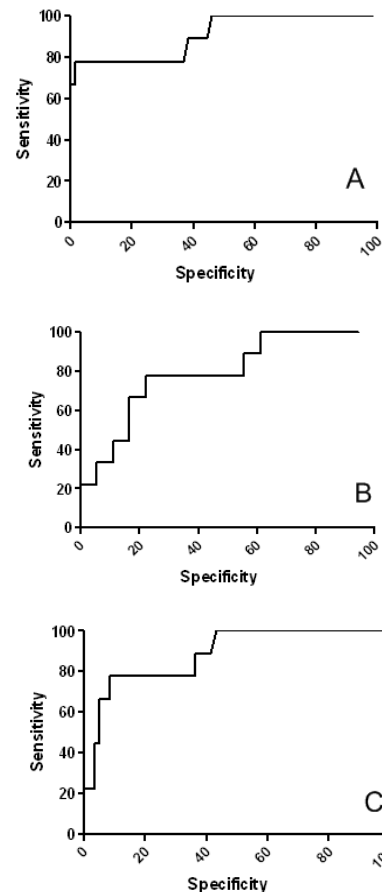


Figura 2. Le curve ROC dei dati HITAlert dei pazienti diagnosticati positivi per HIT contro i pazienti diagnosticati negativi per HIT (A), contro i pazienti diagnosticati con rischio intermedio di HIT (B) e contro i pazienti con basso rischio di HIT (C) (definizione per 4T clinici numerosi). Le aree sotto la curva sono 0.906 (95% intervallo di confidenza 0.790 - 1.023), 0.790 (95% intervallo di confidenza 0.610 - 0.970) e 0.884 (95% intervallo di confidenza 0.774 - 0.994) rispettivamente.

Bibliografia

15. Warkentin TE, and Heddle NM. Laboratory Diagnosis of Immune Heparin-induced Thrombocytopenia. *Current Hematology Reports*, 2003;2:148-157.
16. Tomer, A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1997 Sep;98(3):648-56.
17. Tomer A, Masalunga C, and Abshire TC. Determination of heparin-induced thrombocytopenia: a rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody-mediated platelet activation. *Am J Hematol*. 1999 May;61(1):53-61.
18. Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K, Eichler P, and Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes. *J Thromb Haemost*. 2007; 5; 1666.
19. Tomer A. Sensitivity and specificity of laboratory tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Laboratory Hematology*. 1997;3:174-5.
20. Warkentin TE, Sheppard JI, Raschke R, and Greinacher A. Performance characteristics of a rapid assay for anti-PF4/heparin antibodies: the particle immunofiltration assay. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2308-10.
21. NEN EN ISO 15223-1 Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labeling and information to be supplied - Part 1: General requirements.

Avvertenze















I prodotti qui sotto venduti sono garantiti solo per essere conformi alla quantità e ai contenuti riportati sull'etichetta e riferiti al tempo dal momento della spedizione all'arrivo dal cliente. Non ci sono garanzie, espresse o implicite, estese oltre la descrizione riportata sull'etichetta del prodotto. IQ Products BV non è responsabile per danni alla proprietà, danni personali o economici causati dalla perdita del prodotto.

Caratteristiche

Per assicurare costantemente l'alta qualità dei reagenti, ogni lotto di anticorpi monoclonali è testato per essere conforme con le caratteristiche di un reagente standard.

Vacurette® è un marchio registrato di Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria
www.vacurette.gbo.com

Legenda dei simboli usati

	Consultare le Istruzioni per l'uso
	Numero di catalogo
	Sufficiente per
	Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Attenzione, consultare il documento allegato
	Conservare al riparo dalla luce (solare)
	Rischio biologico
	Limiti di temperatura (°C)
	Ad esclusivo uso di ricerca
	Codice del lotto
	Utilizzare entro aaaa-mm-gg
	Fabbricante
	Mandatario nella Comunità Europea
	Conformité Européenne (Conformità Europea)

Per informazioni contattare

 IQ Products BV
www.iqproducts.nl

Rozenburglaan 13a
 9727 DL Groningen
 The Netherlands
 T +31 (0)50 5757000
 F +31 (0)50 5757002
marketing@iqproducts.nl

Il prodotto è registrato "per uso diagnostico in vitro" nei paesi che appartengono alla Comunità Europea. In tutti gli altri paesi sarà classificato "ad esclusivo uso di ricerca".

©2019 - IQ Products BV tutti i diritti sono riservati.
 Nessuna parte di questi lavori può essere riprodotta in alcuna forma senza il permesso dell'autore.

HITAlert™ Kit

REF 7 IQP-396 ▼ 30 testů ⓘ příbalový leták
 IVD CE In vitro diagnostický kit

Tento výrobek je chráněn podle patentu US 5 763 201. Společnost IQ Products je výhradním držitelem tohoto patentu.

Použití

Výrobek HITAlert™ se používá k detekci komplexu specifických protilátek, které mohou vzniknout po podání heparinu. Tyto protilátky jsou schopné aktivovat trombocyty (krevní destičky) a vést k rozvoji imunitní trombocytopenie, resp. heparinem indukované trombocytopenie (HIT).

Princip testu

Imunitní heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je syndrom, u kterého je užitečná laboratorní detekce patogenních protilátek HIT. Tento test detekuje protilátky na základě jejich charakteristické aktivace krevních destiček a tím se liší od ostatních antigenních testů, které měří protilátky aktivující destičkový faktor 4 (PF 4) – heparinové komplexy, nebo PF 4 – polyanion komplexy. Část patogenních protilátek může být specifická pro komplexy heparinu s jinými proteiny (např. interleukin 8, neutrofilů aktivující peptid-2). HITAlert™ detekuje protilátky, které rozpoznávají heparinové komplexy nezávisle na druhé molekule a prokazuje je jako protilátky schopné vyvolat aktivaci krevních destiček. Protilátky, které se vážou ke komplexu, jsou schopné se vázat na receptor trombocytů Fcγ2b1 a tím trombocyty aktivovat.

Pro HITAlert™ kit se používají donorové destičky (PRP), které se inkubují za přítomnosti séra pacienta a za přítomnosti, nebo nepřítomnosti heparinu. Pokud jsou patogenní látky přítomny, je znázorněna aktivace donorových destiček pomocí markru pro aktivaci destiček. Inkubační vzorků s protilátkami proti destičkám a s aktivačním markrem lze reakci vizualizovat za použití průtokové cytometrie. K hodnocení barveného vzorku je zapotřebí standardní cytometr, který je schopný detekovat fluorescenci FITC (FL-1) a R-PE (FL-2). K vyhodnocení je zapotřebí software. Tento kit je určen k použití jako screeningový test. Výsledky by měly být interpretovány vždy ve spojení s klinickými nálezy, nebo jinými sérologickými testy.

Pro každého pacienta s podezřením na HIT byla použita sada vzorků:

- I. Vzorek donorových destiček (PRP) s heparinem; zobrazuje aktivaci pozadí v důsledku manipulace se vzorkem a vylučuje, že donor destiček (PRP) je pozitivní na HIT
- II. Vzorek PRP s Ca-ionoforem; aktivuje trombocyty, které lze použít k nastavení cytometru
- III. Vzorek donorových destiček (PRP) se sérem pacienta; zobrazuje aktivaci pozadí v závislosti na séru
- IV. Vzorek donorových destiček (PRP) se sérem pacienta a fyziologickou koncentrací heparinu; prokazuje aktivaci v důsledku přítomnosti heparinového komplexu vázajícího protilátky
- V. Vzorek donorových destiček (PRP) se sérem pacienta a přebytkem heparinu; tento vzorek by měl vykazovat pokles aktivace trombocytů v případě pozitivního vzorku IV, protože imunitní komplexy jsou narušeny v důsledku vysoké koncentrace heparinu.

Doporučuje se vždy použít vzorek známého pacienta, pozitivního na HIT II (tento materiál není dodáván).

Obsah kitu

Reagencie A	Testovací pufr	5 ml
Reagencie B	Heparin	150 µl
Reagencie C	Aktivátor krevních destiček (Ca-Ionophore)	1 zkumavka
Reagencie D	Barvicí roztok	20 ml
Reagencie E	Marker pro krevní destičky (Monoklonální protilátka)	200 µl
Reagencie F	Marker pro aktivaci krevních destiček (Rekombinantní protein)	200 µl
Reagencie G	Heparin 1000 U/ml	150 µl
2,2 ml PP zkumavky k inkubační vzorků		30

Každý kit obsahuje dostatečné množství reagií pro testování 6 pacientů (30 testů).

Doporučený spotřební materiál – není součástí kitu

- Průtokový cytometr
- Zkumavky na odběr krve s citrátem, například Greiner Vacuette 454382
- Zkumavky pro průtokový cytometr
- 70% nebo 96% etanol
- Třepačka (například třepačka pro ELISA destičky nebo třepačka pro krevní destičky)
- Laboratorní centrifuga
- Nastavitelné pipety a špičky

Sklovení

Ukládáte při teplotě 2 až 8 °C. Nevystavujte přímému slunečnímu světlu. Reagencie skladované dle uvedených pokynů pro skladování jsou stabilní do data expirace uvedeného na štítku. Pro opakované použití ukládejte reagencie ihned na teplotu 2 až 8 °C a rozpuštěné činidlo C při -20 °C.

Varování a opatření

Reagencie obsahující azid sodný mohou reagovat s olověnou nebo měděnou instalací a tvořit výbušné azidy kovů. Likvidace – proplachujte velkým množstvím vody, aby nedošlo k tvorbě azidu. Veškeré reagencie by měly být používány v souladu se správnou laboratorní praxí a to za použití příslušných bezpečnostních opatření. Se vzorky pacientů zacházejte dle příslušných norem. Nepipetujte ústy a během práce noste ochranné rukavice. Náhradou části kitu jinou reagií může dojít k nekonzistentnímu, nebo chybnému výsledku. S kitem mohou pracovat jen řádně vyškolení laboranti. Pokud je původní sada poškozena, prosím kontaktujte výrobce.

Požadavky na přístroj

- Ujistěte se, že je průtokový cytometr správně nakalibrován dle doporučení výrobce.
- Doporučujeme provádět pravidelnou údržbu a kalibraci přístroje.
- Průtokový cytometr by měl obsluhovat pouze vyškolený laborant. Vyhodnocení výsledků by měla provádět pouze kvalifikovaná osoba, která je schopna interpretovat výsledky z průtokového cytometru.

Odběr a příprava vzorků Plasma bohatá na trombocyty (PRP)

Ne všichni dárce mají krevní destičky vhodné k použití pro funkční testy. PRP několika různých donorů by měla být testována s patientskými vzorky, které jsou pozitivní na HIT. Nejvhodnějším dárce bude jedinec s nejvyšší aktivitou ve vzorku IV (vzorek pacienta s fyziologickou koncentrací heparinu). Důležité je také vyšetření stejných dárce se vzorkem jedinců, kteří jsou negativní na HIT.

Důležité je, aby donor krevních destiček neužíval inhibitory destiček, jako např. aspirin nebo protizápalové léky (např. Ibuprofen, Advil, atd.) poslední 3 – 4 dny před odběrem krve. Tyto inhibitory mohou způsobit selhání testu, i když reagencie C může stále fungovat dobře.

Příprava plasmy bohaté na destičky (PRP)

- Odeberte venózní krev dárce s krevní skupinou 0 do zkumavky s citrátem (např. 454382, Greiner Vacuette) za použití aseptické jehly.
- Jemně promíchejte zkumavku. Zbytečně neprotřepávejte.
- Vzorek krve skladujte při pokojové teplotě (20 až 25 °C) a zpracujte ihned po vytažení.
- Odstředte krev při 100 g po dobu 5 minut s nízkou akcelerací.
- Odstraňte víčko a převedte horní žlutou kapalinu (PRP) do čisté zkumavky. Odeberte jen žlutou kapalinu, vyhněte se červeným (RBC) a bílým (WBC) krvinkám! WBC a RBC jsou pro test nevhodné.
- PRP použijte do 2 hodin od stočení.

Zpracování nového vzorku pacienta

- Odeberte venózní krev pacienta do zkumavky bez aditiv (např. 454045, Greiner Vacuette) za použití aseptické jehly.
- Po odběru séra ho nechte 30 minut stát, utvoří se sraženina a odstředíte 20 minut při 1000 g při pokojové teplotě.
- Odstraňte víčko a převedte horní žlutou kapalinu (sérum) do čisté zkumavky. Vyhněte se bílým a červeným krvinkám a sraženině.
- Vzorek séra skladujte při pokojové teplotě (20 až 25 °C) až do zpracování.
- Vzorek zpracujte do 12 hodin od odběru. Sérum může být skladováno delší dobu při teplotě -80 °C.

Zpracování zmrazeného vzorku pacienta

- Je možné použít i zmrazené sérum, např. pokud je vzorek testován na jiném místě, než kde docházelo k odběru. Doporučuje se použít sérum, které bylo zamrazeno pouze jednou.
- Po rozmrazení uchovávejte vzorky na ledu.
- Vzorky před použitím centrifugujte při vysoké rychlosti (20 minut při 1000 g), aby došlo k oddělení agregátů, nebo použijte filtraci přes odstředivý filtr velikosti 0,2 µm (např. VWR 516-0233).

Postup testování pomocí kitu HITA/ert™

Nepoužívejte předeřháté, nebo tepelně inaktivované sérum pacienta.

- Rozpusťte reagent C v 200 µl 70% nebo 96% etanolu. Tím vznikne zásobní roztok C.
- Roztok dobře promíchejte.
- Pro celkové rozpuštění zásobního roztoku v etanolu počkejte 15 až 30 minut. Je možné, že se v roztoku objeví sraženiny.
- Takto připravený zásobní roztok C lze přímo použít. Poté ho uchovávejte při -20 °C. Lze ho použít pro další stanovení ze stejného kitu.

Inkubace vzorku

- Je důležité, aby byly kroky provedeny opatrně a ve správném pořadí. Prudké míchání může snížit spolehlivost testu.
- Provedte první inkubační krok (tabulka 1) v 2,2 ml zkumavkách, které jsou součástí kitu.
- Do 2 ml zkumavek přidávejte reagent zleva doprava (ujistěte se, že používáte na každý pipetovací krok novou špičku).

Vzorek	Reagencie A	PRP	Vzorek pacienta	Reagencie B	Reagencie G	Reagencie C
I	35 µl	10 µl	---	5 µl	---	---
II	35 µl	10 µl	---	---	---	5 µl
III	30 µl	10 µl	10 µl	---	---	---
IV	25 µl	10 µl	10 µl	5 µl	---	---
V	25 µl	10 µl	10 µl	---	5 µl	---

Tabulka 1. Reagenty přidávané ke vzorku pro inkubaci.

- I: PRP s heparinem
- II: PRP s Ca-ionoforem
- III: PRP se vzorkem pacienta
- IV: PRP se vzorkem pacienta a heparinem
- V: PRP se vzorkem pacienta a 100 U/ml heparinu

- Roztok promíchejte nasátím do špičky a zpět. *Dejte pozor, aby se nevytvořily bublinky.*
- Inkubujte zkumavky při pokojové teplotě (20 až 25 °C) na horizontální třepače po dobu jedné hodiny. Třepání musí být dostatečně rychlé, ale zároveň se *nesmí tvořit bublinky.*

Barvení vzorků

- Připravte 5 zkumavek (vhodných pro průtokovou cytometrii) a označte je I, II, III, IV a V.
- V nové zkumavce připravte směs 210 µl činidla D, 30 µl činidla E a 30 µl činidla F, dobře promíchejte.
- Do každé zkumavky z 10. kroku přidejte 45 µl tohoto činidla. Zkumavky uchovávejte v temnu až do doby, kdy budou připraveny inkubované vzorky.
- Po 1 hodině inkubace (9. krok), přidejte 5 µl směsi vzorku do příslušné zkumavky s barvivem. Opatrně pomocí pipety směs promíchejte. *Dejte pozor, aby se nevytvořily bublinky.* Tuto směs inkubujte 15 minut při pokojové teplotě (20 až 25 °C) a v temnu.
- Přidejte 400 µl činidla D.
- Nyní jsou vzorky připraveny pro průtokovou cytometrii. Prosím proveďte stanovení na cytometru co nejdříve a ne později než 30 minut od přidání činidla D.

Sběr dat

Nastavení průtokového cytometru

Pro nastavení průtokového cytometru se používají 3 zkumavky (tabulka 2):

- Tři zkumavky (vhodné pro průtokovou cytometrii) označte S1, S2 a S3.
- Dle tabulky 2 přidejte do zkumavek reagenty. Ujistěte se, že do každé zkumavky dáváte 5 µl vzorku II.
- Opatrně zkumavky promíchejte a dejte pozor, aby se netvořily bublinky. Inkubujte při pokojové teplotě a v temnu po dobu 15 minut.
- Do každé zkumavky přidejte 400 µl činidla D.
- Nyní jsou vzorky připraveny k nastavení průtokového cytometru.

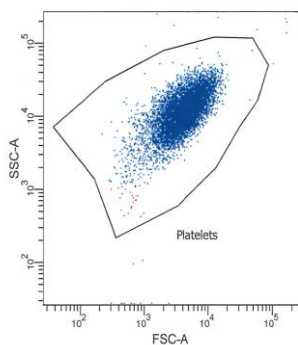
Zkumavka	Vzorek (5 µl)	Reagencie D	Reagencie E	Reagencie F
S1	II	45 µl	---	---
S2	II	40 µl	5 µl	---
S3	II	40 µl	---	5 µl

Tabulka 2. Směs reagií pro nastavení průtokového cytometru. Trombocyty se používají z testovacího vzorku II (4. krok).

Analýza

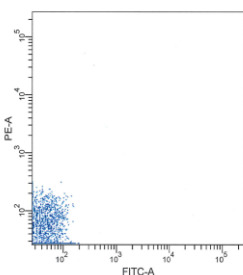
- Vytvořte si tři bodové grafy – Forward scatter (FSC) vs. Sideward Scatter (SSC) s logaritmickou stupnicí pro výběr krevních destiček, R-PE vs. SSC pro výběr pozitivních krevních destiček a FITC vs. R-PE k určení aktivace krevních destiček.
- Pomocí zkumavky S1 nastavte napětí pro FSC-SSC.

Pomocí oblasti vyberte všechny krevní destičky a nastavením příslušné prahové hodnoty FSC (Cytogram 1) vylučte šum pozadí. Netvořte hranici příliš těsně na spodní levé straně. Po aktivaci krevních destiček se hodnota sníží (mikrovesikuly). Tato hranice se může překontrolovat pomocí zpětného posunu aktivizačních markrů a destičkového markru pozitivních buněk z 5. kroku. Oblast aktivujte pro další hodnocení.



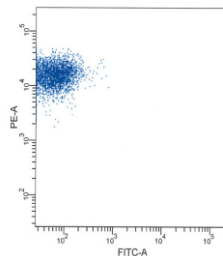
Cytogram 1. SSC (vertikální)/ FSC (horizontální) bodový graf a oblast pro výběr krevních destiček.

Vzorek S1 se také používá k nastavení FL-1 a FL-2 fotonásobiče (PMT). Vytvořte FL-1/ FL-2 bodový graf a nastavte základní signál FL-1/ FL-2 v levém dolním rohu (Cytogram 2).

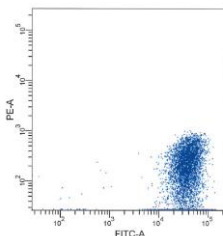


Cytogram 2. Správné nastavení PMT napětí pro FL-2 (vertikální) a FL-1 (horizontální) pro nezjištěný vzorek.

- Vzorek S2 a S3 se používají pro nastavení kompenzace. Toto kompenzační nastavení mezi fluorescenčním signálem FITC (FL-1) a R-PE (FL-2) by mělo být optimalizováno tak, aby správně oddělilo stimulované (FL-1 pozitivní) od nestimulovaných (FL-1 negativní) krevních destiček.
 - Použijte vzorek S2 pro nastavení kompenzace R-PE (FL-2) z kanálu FITC (FL-1) (Cytogram 3).
 - Použijte vzorek S3 pro nastavení kompenzace FITC (FL-1) z kanálu R-PE (FL-2) (Cytogram 4).



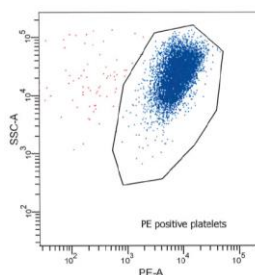
Cytogram 3. Kompenzace R-PE (FL-2, vertikální) signálu z FL-1 (horizontální) kanálu.



Cytogram 4. Kompenzace FITC (FL-1, horizontální) signálu z FL-2 (vertikální) kanálu.

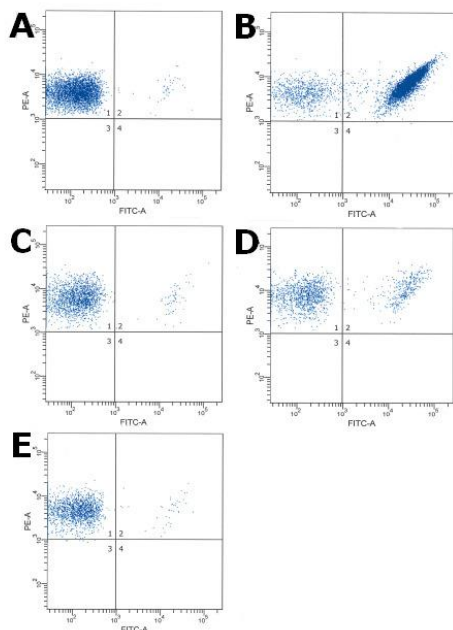
- Po výběru pozitivních markrů krevních destiček (FL-2) mohou být vzorky analyzovány pomocí SSC/ FL-2 bodového grafu. Ujistěte se, že jste také zvolili pozitivní pomocné částice. Jedná se o částice trombocytů, které se tvoří po aktivaci krevních destiček.

Pro FSC, SSC a fluorescenční signály pro obě protilátky konjugované s fluorochromem, které mají oblast ukotvenou na krevní destičce (SSC / R-PE) by měly být shromážděny soubory se seznamem nejméně 10 000 případů. Méně než 10 000 případů ovlivní přesnost testu.



Cytogram 5. Výběr R-PE pozitivních krevních destiček v SSC – R-PE grafu.

- Hodnocení se provádí pomocí kvadrantu, který je umístěn těsně pod pozitivní populací markeru krevních destiček a právě k této populaci (viz. Cytogram 6A, B, C, D a E). Procento aktivovaných destiček je vyjádřeno jako procento populace destiček. Ujistěte se, že oblasti z Cytogramu 1 a Cytogramu 5 jsou obě aktivovány.



Cytogram 6. Typický výsledek z jedné sady testů pozitivního pacienta provedené pomocí kitu HITAlert a vyhodnocené na BD FACSCanto II. **A.** nestimulovaný vzorek (I.) **B.** vzorek stimulovaný Ca-ionoforem (II.) **C.** vzorek pacienta bez heparinu (III.) **D.** vzorek pacienta s heparinem (IV) **E.** vzorek pacienta s přebytkem heparinu (V.)

Výsledek

Výsledky hodnocení krevních vzorků pacientů jsou kvalitativním a spolehlivým zdrojem pro stanovení přítomnosti specifických patogenních heparinových protilátek v periferní krvi.

Interpretace

	Pacient negativní na HIT	Pacient velmi pravděpodobně pozitivní na HIT
Vzorek I	< 5 %	< 5%
Vzorek II	80 – 100 %	80 – 100 %
Vzorek III	< 5 %	aktivace (méně než) poloviny vzorku IV
Vzorek IV	< 5 %	≥ 8 %
Vzorek V	< 5 %	aktivace (méně než) poloviny vzorku IV

Tabulka 3. Typický výsledek pro pacienta negativního na HIT a pacienta pozitivního na HIT. Typický výsledek pacienta pozitivního na HIT pomocí soupravy HITAlert™ znázorňuje Cytogram 6D. U vzorků IV se mohou objevit meziprodukty mezi 5 a 8%, tyto vzorky pacientů by měly být znovu testovány (viz odstavec "Vzorky III, IV a V").

Vzorek I

Nestimulovaný vzorek destiček (I.) by měl mít méně než 1 % pozitivních aktivačních markerů krevních destiček. Pokud je toto procento vyšší než 5 %, měl by se test znovu opakovat. Pokud možno s jinými donory PRP.

Vzorek II

Vzorek II stimulovaný Ca-ionoforem by měl mít více než 80 % pozitivních aktivačních markerů krevních destiček. Pokud je hodnota nižší než 80 %, mohlo dojít ke špatnému rozpouštění Ca-ionoforu před jeho použitím.

Vzorek III, IV, V

Typický výsledek je znázorněn v tabulce 3. Podle tabulky 3 by měl mít pacient s velmi pravděpodobnou pozitivitou pro HIT aktivaci ≥ 8% ve vzorku IV, zahrnující PRP s heparinem a vzorkem pacienta. Zatímco pacient negativní pro HIT by měl mít ve vzorku IV aktivaci <5%. Příležitostně je ve vzorku IV pozorována střední aktivace (5-8%), tento pacient by měl být opětovně testován po přípravě nového vzorku ideálně s jiným donorem PRP.

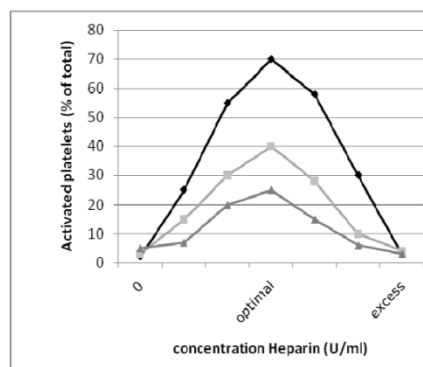
Z tabulky 3 existují výjimky:

Vzorek pacienta již může obsahovat komplex heparinových protilátek.

Počet aktivačních markerů ve vzorku IV je ≥ 8 %, ale mezi vzorkem III a IV neexistuje žádný významný rozdíl. Vzorek V ukáže aktivaci (typicky polovina aktivace, nebo nižší), která je výrazně nižší než u vzorku IV. Aktivace krevních destiček je v tomto případě závislá na heparinu a výsledek na HIT je orientační (nahlédněte do omezení postupu).

Aktivace je nezávislá na heparinu

Počet pozitivních aktivačních markerů ve vzorku IV je ≥ 8 %, ale neexistuje žádný významný rozdíl mezi vzorky III, IV a V. Přidání fyziologického heparinu, nebo heparinu ve vysokých koncentracích neovlivňuje procento aktivovaných destiček; aktivace destiček není závislá na heparinu, obecně je stejná ve všech třech vzorcích.



Obrázek 1. Typická hodnota aktivovaných trombocytů při různých koncentracích heparinu. Heparin v Reagencii B (ve vzorku IV) se přidá do vzorku s optimální koncentrací heparinu pro aktivaci. Heparin v Reagencii G představuje přebytek koncentrace [ref 2]

HITAlert™ kit by měl být používán pouze jako screeningový test. Výsledky by měly být interpretovány v závislosti na klinických nálezech, nebo jiných sérologických testech.

Kontrola kvality

Všechny reagenty kitu HITAlert™ jsou součástí kontroly kvality.

Omezení postupu

- Odběr vzorku za aseptických podmínek by měli provádět jen zkušení pracovníci.
- Personál by měl být proškolen na práci s průtokovým cytometrem a měli by mít zkušenosti s interpretací dat.
- Kit HITAlert™ je vyroben pro použití na průtokových cytometrech, *nikoliv* pro použití na hematologických analyzátoch, nebo imunofluorescenčních mikroskopech.
- Přesné výsledky z průtokového cytometru jsou závislé na kalibraci laseru a detektorů. Laborať by se měla starat o správnou kalibraci a údržbu.
- Postupy pro kontrolu kvality by měly být prováděny pravidelně, jak je uvedeno v návodu na obsluhu, dodávaného s průtokovým cytometrem.

- Tento test může poskytnout falešně pozitivní výsledky, pokud je používána PRP plazma od dárců, kteří mají A, B nebo AB pozitivní fenotyp. Krevní destičky by měly být získány od dárců s 0.
- Nespolehlivé výsledky lze očekávat u pacientů, kteří mají (je to známo) HAMA*, jsou nachlazení, nebo mají autoaglutininy. V klinické studii byly používány pouze vzorky od osob bez problémů se srážlivostí, jako je ITP a ostatní.
- Agregace krevních destiček a autofluorescence červených krvinek může rovněž vést k nespolehlivým výsledkům.
- Hemolytické, ikterické, lipemické (nadměrná povaha), bakteriálně kontaminované vzorky, vzorky od pacientů s myelomem nebo kontroly z jiných testovacích sad nebyly testovány a mohou způsobit chybné výsledky.
- Sada HITAlert™ by měla být používána jako screeningový test. Výsledky by měly být interpretovány ve spojení s klinickými nálezy a dalšími sérologickými testy.

* HAMA = Lidská protilátka proti myši

Výkonnostní charakteristika

Specifita vazby protilátky

Protilátka použitá v tomto testu byla klasifikována v Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshop.

Klinické hodnocení

Během klinické studie byl kit HITAlert™ porovnán s IVD testem PF4 IgG ELISA (používán podle pokynů výrobce) ve dvou studiích. Zde je pouze část studie.

Celkem bylo testováno 195 vzorků s podezřením na HIT. Data z ELISA testování byly známa u všech vzorků, avšak data o konečné klinické diagnóze (n = 149) a agregaci (n = 44) byly dostupné jenom u části vzorků.

Křivka Receiver Operating Characteristic (ROC) je dobrou metodou pro srovnání diagnostického testu, v tomto případě souboru HITAlert™ se známou klinickou diagnózou. Křivka ROC vyjadřuje vztah mezi senzitivitou (schopnost detekovat onemocnění) a specifitou (schopnost odhalit nepřítomnost onemocnění). K návrhu ROC křivek byla data rozdělena do skupin: bez HIT, nízké riziko HIT, střední riziko HIT a pozitivně diagnostikované HIT.

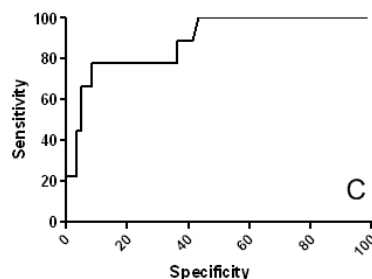
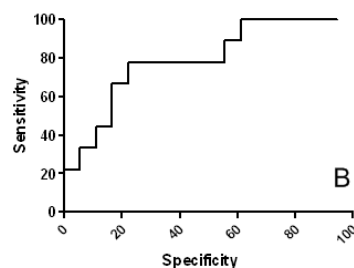
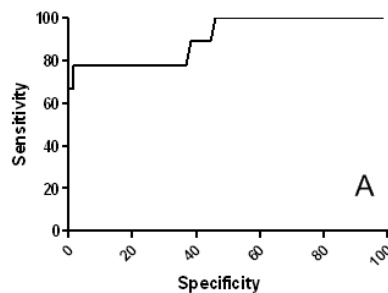
Křivka (ROC) ukazuje, že nejlepší mezní hodnotou pro rozlišení pozitivních a negativních vzorků je 8 %. Na této úrovni dokáže test rozlišit skupiny bez HIT a s diagnózou HIT so 78% senzitivitou (95% interval spolehlivosti 40 - 97 %) a specifitou 98 % (95% interval spolehlivosti 91 - 100 %). Stejná 8% mezní hodnota byla stanovena pro rozlišení vzorků s nízkým a středně rizikovým skóre 4T ve srovnání s HIT.

Limit 8 % je v souladu s publikací Tomer *et al.* (2), kde byl výsledný limit 6,6 % u omezeného počtu vzorků. Stejný článek uvádí senzitivitu 95 % a specifitu 100 % při porovnání průtokové cytometrie se SRA.

Při hranici 5 % aktivace je citlivost 78 % (95% interval spolehlivosti: 40 % až 97 %) a specifita je 87 % (95% interval spolehlivosti: 77 % až 94 %).

ROC křivky srovnávací kit HITAlert™ se skupinou bez HIT („zdravý“, plocha pod křivkou 0,906 (95% interval spolehlivosti 0,790 - 1,023)), nízké riziko (plocha pod křivkou 0,884 (95% interval spolehlivosti 0,774 - 0,994)) a střední riziko (plocha pod křivkou 0,790 (95% interval spolehlivosti 0,610 - 0,970)) jsou znázorněny na obrázku 2. Z příslušných křivek je zřejmé, že test rozlišuje vzorky s HIT na negativní, s nízkým a středním rizikem.

Lze konstatovat, že souprava HITAlert™ bude pozitivně identifikovat pacienty s nejvyšším skóre 4T.



Obrázek 2. ROC křivky z dat kitu HITAlert™ u pacientů s pozitivní diagnózou na HIT proti pacientům negativním na HIT (A), dále pacientů se středním rizikem na HIT (B) a pacientů s nízkým rizikem na HIT (C) (definováno klinickým skóre 4T). Oblasti pod křivkou jsou v pořadí 0,906 (95% interval spolehlivosti 0,790 - 1,023), 0,790 (95% interval spolehlivosti 0,610 - 0,970) a 0,884 (95% interval spolehlivosti 0,774 - 0,994).

Literatura

1. Warkentin TE, and Heddle NM. Laboratory Diagnosis of Immune Heparin-induced Thrombocytopenia. *Current Hematology Reports*, 2003;2:148-157.
2. Tomer, A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 1997 Sep;98(3):648-56.
3. Tomer A, Masalunga C, and Abshire TC. Determination of heparin-induced thrombocytopenia: a rapid flow cytometric assay for direct demonstration of antibody-mediated platelet activation. *Am J Hematol.* 1999 May;61(1):53-61.
4. Greinacher A, Juhl D, Strobel U, Wessel A, Lubenow N, Selleng K, Eichler P, and Warkentin TE. Heparin-induced thrombocytopenia: a prospective study on the incidence, platelet-activating capacity and clinical significance of antiplatelet factor 4/heparin antibodies of the IgG, IgM, and IgA classes. *J Thromb Haemost.* 2007; 5; 1666.
5. Tomer A. Sensitivity and specificity of laboratory tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Laboratory Hematology.* 1997;3:174-5.
6. Warkentin TE, Sheppard JI, Raschke R, and Greinacher A. Performance characteristics of a rapid assay for anti-PF4/heparin antibodies: the particle immunofiltration assay. *J Thromb Haemost* 2007; 5: 2308-10.
7. NEN EN ISO 15223-1 Medical devices - Symbols to be used with medical device labels, labeling and information to be supplied - Part 1: General requirements.

Záruka

Výrobky nesou záruku pouze v souladu s množstvím a obsahem uvedeným na štítku v okamžiku dodání. Neexistují žádné záruky, vyjádřené nebo předpokládané, které přesahují popis výrobku popsáno na štítku. IQ Products neodpovídá za škody na majetku, zranění nebo ekonomické ztráty způsobené výrobkem.

Charakterizace

Pro zajištění vysoké kvality reagensů, je každá dávka monoklonální protilátky testována na shodu s charakteristikami standardního činidla.

Vacurette® je registrovaná ochranná známka společnosti Greiner Bio-One, Krefsmuenster, Rakousko
www.vacurette.qbo.com

Vysvětlení použitých symbolů



Postupujte dle pokynu použití

Katalogové číslo

Dostatečný pro



In vitro diagnostická zdravotnická

Zařízení



Pozor, přečtěte si příložený dokument



Biologická rizika



Omezení teploty (°C)



Pouze pro výzkumné účely



Sériové číslo



Použijte do rrrr-mm-dd



Výrobce



Oprávněný zástupce v ES



Conformité Européenne (Evropská shoda)

Kontaktní informace

 IQ Products BV

www.iqproducts.nl

Rozenburglaan 13a

9727 DL Groningen

The Netherlands

T +31 (0)50 5757000

F +31 (0)50 5757002

marketing@iqproducts.nl

Tento produkt je registrován jako „kit k diagnostickému použití in vitro“ v zemích ES. Ve všech ostatních zemích by měla být označena jako „pouze pro výzkumné účely“.

© 2019 - Produkty IQ bv. Všechna práva vyhrazena. Žádná část těchto děl nesmí být reprodukována v žádné formě bez písemného povolení.