

HITAlert™ Kit

REF⁷ IQP-396 ▽ 30 Tests **P** Packungsbeilage
IVD **CE** 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-Phiolen 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.

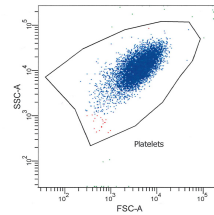
- I: PRP mit Heparin
- II: PRP mit Calcium Ionophor
- III: PRP mit Patientenprobe
- IV: PRP mit Patientenprobe und Heparin
- V: PRP mit Patientenprobe und 100 U/ml Heparin

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 Röhrcchen (für Durchflusszytometrie geeignet) mit I, II, III, IV und V beschriften.
11. In einem neuen Röhrcchen 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 Röhrcchen aus Schritt 10 hinzufügen. Die Röhrcchen 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 Röhrcchen 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 Röhrcchen 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.

„Backgating“ des Aktivierungsmarkers und der positiven Zellen des Plättchenmarkers aus Schritt 5 überprüft werden. Das Analysefenster für den nächsten Schritt der Auswertung aktivieren.



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

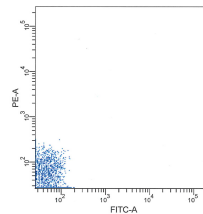
Datenerfassung

Einstellung des Durchflusszytometers

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

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

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.

Röhrcchen	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

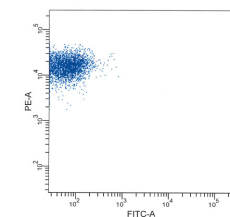
Tabelle 2. Komponenten, die für die Einstellung des Durchflusszytometers zu vermischen sind. Es werden Plättchen aus Testprobe II (Schritt 4) verwendet.

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.

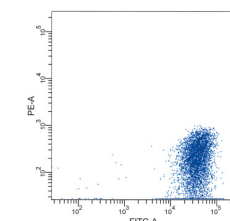
Analyse

1. Drei Dot-Plots erstellen, einen Dot-Plot zu Vorwärtsstreulicht (FSC) vs. Seitwärtsstreulicht (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 Röhrcchen S1 die Spannung für den FSC-SSC einstellen.



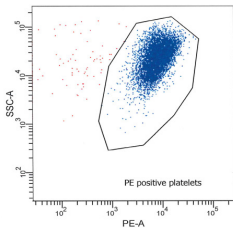
Zytogramm 3. Kompensation des R-PE-Signals (FL-2, vertikal) im FL-1-Kanal (horizontal).

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



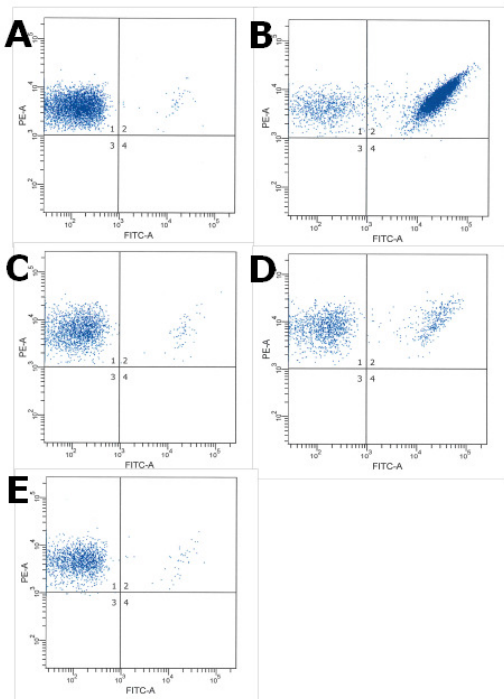
Zytogramm 4. Kompensation des FITC-Signals (FL-1, horizontal) im FL-2-Kanal (vertikal).

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.



Zytogramm 5. Auswahl der R-PE-positiven Plättchen im

5. 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	< 8 %	≥ 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.

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 k 8 % aufweisen. Tabelle 4 zeigt die typischen Ergebnisse.

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 ≥ 8%, aber es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den Proben 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 ≥ 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.

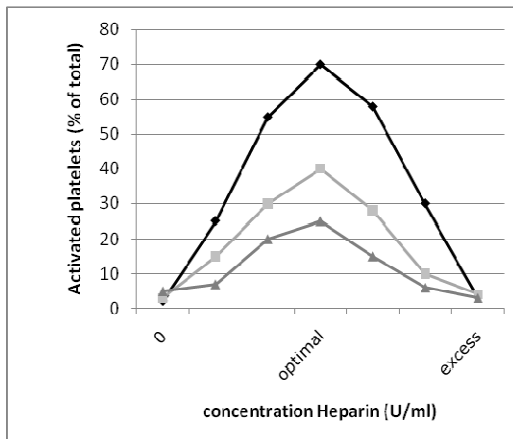


Abbildung 1: Typische Form für die Plättchenaktivierung bei verschiedenen Heparinkonzentrationen. Das Heparin in Reagens B (in Probe IV) wird der Probe in der optimalen Heparinkonzentration für die Aktivierung zugegeben. Das Heparin in Reagens G stellt die überschüssige Konzentration dar [Ref. 2]

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.

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.

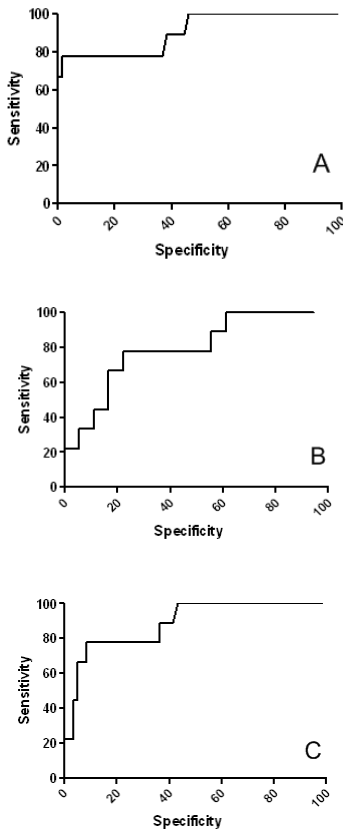


Abbildung 2. ROC-Kurven der Daten des HITAlert™ Kit von Patienten mit positiver HIT-Diagnose gegenüber Patienten mit negativer HIT-Diagnose (A), gegenüber Patienten mit der Diagnose eines moderaten HIT-Risikos (B) und gegenüber Patienten mit einem geringem HIT-Risiko (C) (Definition nach dem klinischen 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

1. Warkentin TE und 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 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.
4. 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.
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 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.
7. 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 für die Verwendung als „In-vitro-Diagnostikum“ in allen Ländern zugelassen, die zur Europäischen Gemeinschaft gehören. In allen anderen Ländern sollte es mit „nur für Forschungszwecke“ gekennzeichnet werden.

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

©2014 - IQ Products bv. Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil dieser Dokumente darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Genehmigung wiedergegeben werden.