



HITAlert™ Kit

*Diagnosis of Heparin Induced Thrombocytopenia (HIT)
by flow cytometry*

REF⁷ IQP-396 ▾ 30 tests **i** package insert

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

UDI-DI 87179530223IQP-396NX

Barcode GS1 (GTIN): 8719327450918

INTERNATIONAL PACKAGE INSERT

English	3
Deutsch	9
Česky	15

Other languages of this Product's Instruction for Use (IFU) / Product Insert can be found at the World Wide Web at www.iqproducts.nl. Copies may also be requested by sending an email request to marketing@iqproducts.com or by contacting your local product distributor.

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

©2023 - IQ Products bv. All rights reserved. No parts of these works may be reproduced in any form without permission in writing.

HITAlert™ Kit

Diagnosis of Heparin Induced Thrombocytopenia (HIT) by flow cytometry

 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

Immune heparin induced thrombocytopenia (HIT) is a distinct syndrome in which laboratory detection of the pathological HIT antibodies is diagnostically useful. The HITAlert™ Kit, a qualitative, rapid, non-automated and flow cytometric platelet activation assay, detects antibodies based on their characteristic platelet-activating properties in venous blood samples of patients suspected of HIT. This HITAlert™ Kit should be used as a screening test and only be executed and interpreted by well-trained and authorized laboratory technicians. The results should always be used in conjunction with clinical findings and other serological tests.

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.

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. For detailed information please find the Safety Data Sheet on: www.iqproducts.nl. Please be aware of the obligation of users of this kit to notify the manufacturer and designated authorities about incidents concerning this product.

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 is 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 HITAlert™ 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 also be used for the next assays from the same kit.

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.

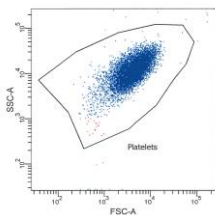
Tube	Samples (5 µl)	Reagent D	Reagent E	Reagent F
S1	II	45 µl	---	---
S2	II	40 µl	5 µl	---
S3	II	40 µl	---	5 µl

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

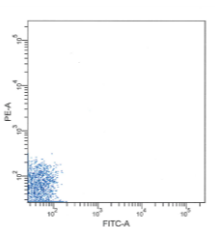
1. Make three dot plots, a Forward scatter (FSC) vs. Sideward Scatter (SSC) dot plot with logarithmic scale to select the platelets, a R-PE vs. SSC dot plot to select the platelet marker positive events and a FITC vs. R-PE dot plot to determine the activation of the platelets.
2. Adjust the voltage settings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

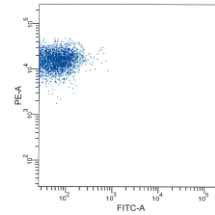
Sample S1 is also used to adjust the FL-1 and FL-2 photomultiplier tube (PMT) voltages. Make a FL-1/FL-2 dot plot and set the FL-1/FL-2 baseline signals in the lower left corner in an FL-1 vs. FL-2 dot plot (see Cytogram 2).



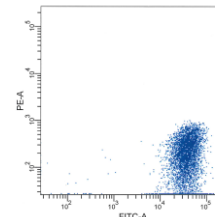
Cytogram 2. Correct adjustment of the PMT voltages for FL-2 (vertical) and FL-1 (horizontal) of the unstained sample.

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 FITC (FL-1) (horizontal) channel.

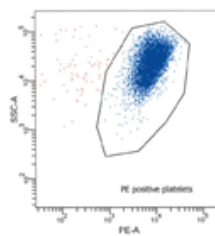


Cytogram 4. Compensation of FITC (FL-1, horizontal) signal from the FL-2 (vertical) channel.

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.

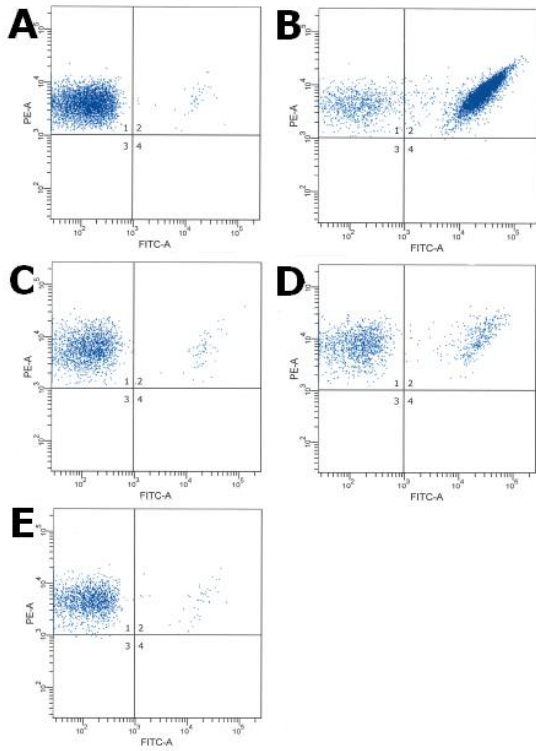
List mode files of at least 10.000 events should be collected for FSC, SSC, and fluorescence signals for both fluorochrome conjugated antibodies with the region gated at the platelets (SSC/R-PE). Less than 10.000 events will influence the accuracy of the assay.

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. Results should be used in conjunction with clinical findings or other serological tests.

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.

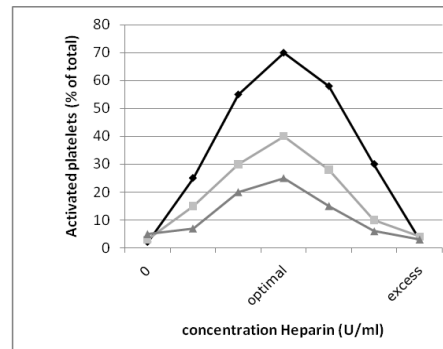


Figure 1: A typical figure for platelet activation at different heparin concentrations. The heparin in Reagent B (in sample IV) is added to the sample in the optimal concentration heparin for activation. The heparin in Reagent G is representing the excess concentration [ref 2].

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 0-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

Analytical evaluation

The antibody used in this assay has been typed in the Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshop. Furthermore, in-house study results showed provided evidence for high sensitivity and accuracy of the assay.

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.

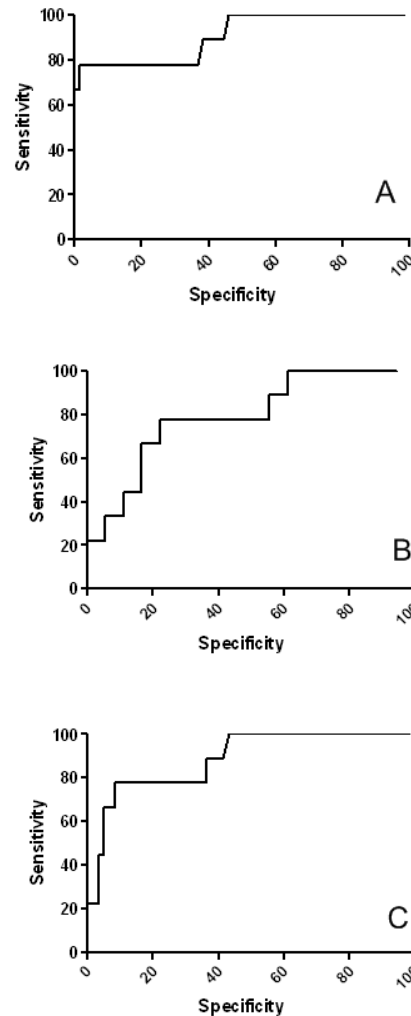


Figure 2. ROC curves of the HITAlert™ Kit data of patients diagnosed positive for HIT against the patients diagnosed negative for HIT (A), against the patients diagnosed with intermediate risk of HIT (B) and against the patients with low risk of HIT (C) (definition by 4T clinical score). Areas under 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.

Regulatory status

At this time, the HITAlert™ kit is registered as an "in vitro diagnostic medical device" in Peru, Switzerland, United Kingdom and countries that belong to the European Community. In all other countries, it should be labeled "for research use only".

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.

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



Advena Limited
Plato Close, Tachbrook Park
Warwick. CV34 6WE. UK



Casus Switzerland GmbH
Hinterbergstrasse 49
Steinhausen, 6312, Switzerland

©2023 - IQ Products bv. All rights reserved. No parts of these works may be reproduced in any form without permissions in writing.

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. Vacuette® is a registered trademark of Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria
www.vacuette.gbo.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)
	Authorized Representative in the UK
	United Kingdom Conformity Assessed
	Authorized Representative for Switzerland

HITAlert™ Kit

Durchflußzytometrische Diagnose Immunheparin-Induzierte Thrombozytopenie (HIT)

 REF⁷ IQP-396  30 Tests  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

Immunheparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist ein eigenständiges Syndrom, bei dem der Labornachweis der pathologischen HIT-Antikörper diagnostisch nützlich ist. Der HITAlert™ Kit, ein qualitativer, schneller, nicht automatisierter und durchflußzytometrischer Thrombozytenaktivierungsassay, der Antikörper anhand ihrer charakteristischen thrombozytenaktivierenden Eigenschaften in venösen Blutproben von Patienten mit HIT-Verdacht nachweist. Dieser HITAlert™ Kit sollte als Screening-Test verwendet und nur von gut ausgebildeten und autorisierten Labortechnikern durchgeführt und interpretiert werden. Die Ergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit den klinischen Befunden und anderen serologischen Tests verwendet werden.

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 den 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.

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. Detaillierte Informationen finden Sie im Sicherheitsdatenblatt unter: www.iqproducts.nl.

Bitte beachten Sie die Verpflichtung der Benutzer dieses Kits, den Hersteller und die benannten Behörden über Vorfälle in Bezug auf dieses Produkt zu informieren.

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

Datenerfassung

Einstellung des Durchflusszytometers

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

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

Röhrrchen	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

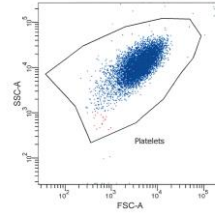
Tabelle 2. Komponenten, die für die Einstellung des Durchflusszytometers zu vermischen sind. Es werden Plättchen aus Testprobe II (Schritt 4) verwendet.

Analyse

1. Drei Dot-Plots erstellen, einen Dot-Plot zu 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 Röhrrchen S1 die Spannung für den FSC-SSC einstellen.

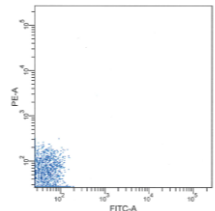
Unter Verwendung eines Analysefensters alle Plättchen auswählen und Zelltrümmer und Hintergrundgeräusche durch Einstellen des richtigen FSC-Grenzwerts ausschließen (siehe Zytogramm 1). Das Gate auf der unteren, linken Seite nicht zu eng machen. Nach

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.



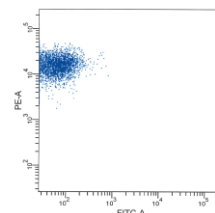
Zytogramm 1. SSC (vertikal) / FSC (horizontal) Dot-Plot und Analysefenster zur Auswahl der Plättchen.

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).

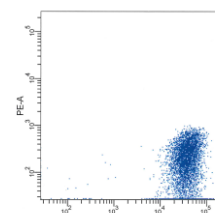


Zytogramm 2. Korrekte Einstellung der PMT-Spannungen für FL-2 (vertikal) und FL-1 (horizontal) der ungefärbten Probe.

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.

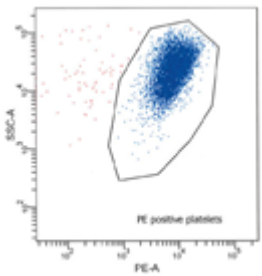


Zytogramm 3. Kompensation des R-PE-Signals (FL-2, vertikal) im FL-1-Kanal (horizontal).



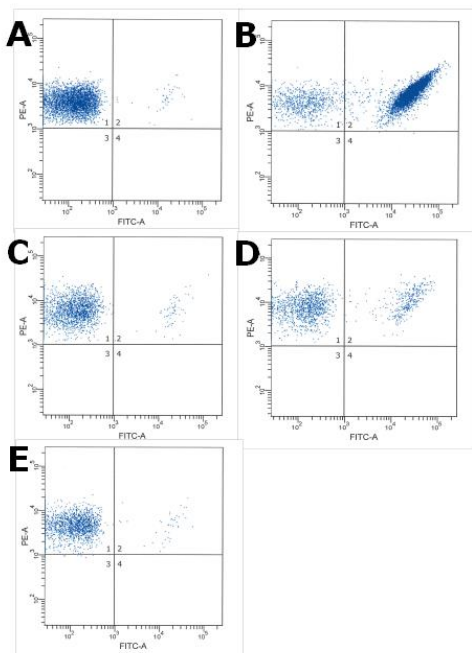
Zytogramm 4. Kompensation des FITC-Signals (FL-1, horizontal) im FL-2-Kanal (vertikal).

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.

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.

Die Ergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit den klinischen Befunden und anderen serologischen Tests verwendet werden.

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 \geq 8%
Probe IV	< 5 %	
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.

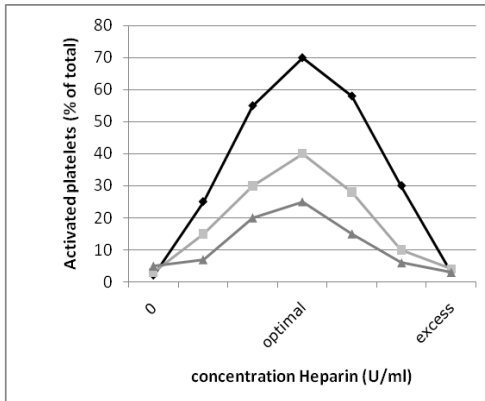


Abbildung 1: Typische Form für die Plättchenaktivierung bei verschiedenen Heparinkonzentrationen. Das Heparin in Reagens B (in Probe IV) wird der Probe in der optimalen Heparinkonzentration für die Aktivierung zugegeben. Das Heparin in Reagens G stellt die überschüssige Konzentration dar [Ref. 2]

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.

* HAMA = Humane Anti-Maus-Antikörper

Leistungsmerkmale

Analytische Auswertung

Der Antikörper, der in diesem Test verwendet wurde, wurde im HLDA-Workshop (Humane Leukozyten-Differenzierungs-Antigene) typisiert. Darüber hinaus zeigten interne Studienergebnisse, dass der Assay eine hohe Empfindlichkeit und Genauigkeit aufweist.

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.

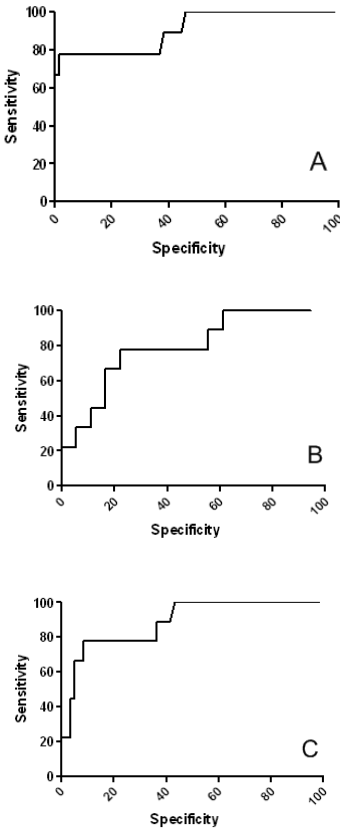


Abbildung 2. ROC-Kurven der Daten des HITAlert™ Kit von Patienten mit positiver HIT-Diagnose gegenüber Patienten mit negativer HIT-Diagnose (A), gegenüber Patienten mit der Diagnose eines moderaten HIT-Risikos (B) und gegenüber Patienten mit einem geringem HIT-Risiko (C) (Definition nach dem klinischen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

Produktregistrierung

Der HITAlert™ Kit ist in Peru, der Schweiz, Großbritannien und allen Ländern der Europäischen Union zur In-Vitro-Diagnostik zugelassen. Für alle anderen Ländern ist dieses Produkt nur für Forschungszwecke bestimmt.

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)
	Bevollmächtigter Vertreter für die Schweiz

Kontakt

IQ Products BV
www.iqproducts.nl

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

Casus Switzerland GmbH
 Hinterbergstrasse 49
 Steinhausen, 6312, Switzerland

©2023 - IQ Products bv. Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil dieser Dokumente darf in irgendeiner Form ohne schriftliche Genehmigung wiedergegeben werden.

HITAlert™ Kit

Diagnóza Imunní heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) průtokovou cytometrií

REF⁷ 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

Imunitní heparinem indukovaná trombocytopenie (HIT) je klinicky výrazný syndrom, u kterého je užitečná laboratorní detekce patogenních protilátek HIT. Sada HITAlert™, kvalitativní, rychlý, neautomatizovaný test, který pomocí průtokové cytometrie detekuje protilátky na základě jejich charakteristické aktivace krevních destiček ve vzorcích venózní krve pacientů s podezřením na HIT. Tato sada HITAlert™ by měla být používána jako screeningový test a měla by být prováděna a interpretována pouze vyškolenými a autorizovanými laboratorními technikami. Výsledky by měly být interpretovány vždy ve spojení s klinickými nálezy, nebo jinými sérologickými testy. Výsledky interních studií dále prokázaly vysokou citlivost a přesnost testu.

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 Fcγ₂ 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. Inkubací 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.

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 inkubaci vzorků		30

Každý kit obsahuje dostatečné množství reagensů 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

Skladování

Uskladněte 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 olovenou 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. Podrobné informace najdete v bezpečnostním listu na: www.iqproducts.nl Uvědomte si, prosím, povinnost uživatelů této sady informovat výrobce a určené orgány o událostech týkajících se tohoto produktu. Náhradou části kitu jinou reagensy 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 dárců se vzorkem jedinců, kteří jsou negativní na HIT.

Důležité je, aby donor krevních destiček nežíval 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 reagensie C může stále fungovat dobře.

Příprava plasmu 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 odstřeďujte 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 HITAlert™

Nepoužívejte předeřháté, nebo tepelně inaktivované sérum pacienta.

- Rozpusťte reagensii 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 reagensie zleva doprava (ujistěte se, že používáte na každý pipetovací krok novou špičku).

Vzorek	Reagensie A	PRP	Vzorek pacienta	Reagensie B	Reagensie G	Reagensie 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. Reagensie 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 reagensie. 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.

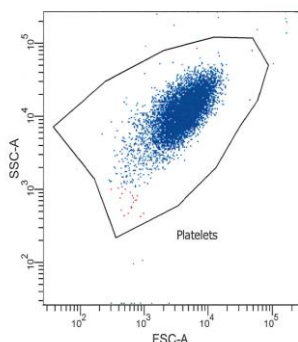
Zkumavka	Vzorek (5 µl)	Reagencie D	Reagencie E	Reagencie F
S1	II	45 µl	---	---
S2	II	40 µl	5 µl	---
S3	II	40 µl	---	5 µl

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

Analýza

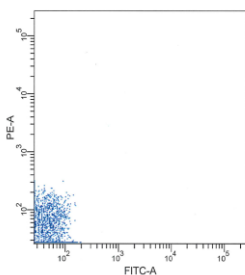
- Vytvořte si tři bodové grafy – Forward scatter (FSC) vs. Sideward Scatter (SSC) s logaritmickou stupnicí pro výběr krevních destiček, R-PE vs. SSC pro výběr pozitivních krevních destiček a FITC vs. R-PE k určení aktivace krevních destiček.
- Pomocí zkumavky S1 nastavte napětí pro FSC-SSC.

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 aktivčních markrů a destičkového markru pozitivních buněk z 5. kroku. Oblast aktivujte pro další hodnocení.



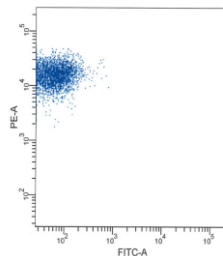
Cytogram 1. SSC (vertikální)/ FSC (horizontální) bodový graf a oblast pro výběr krevních destiček.

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).

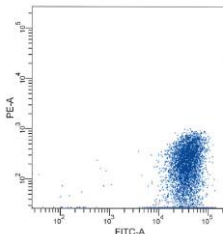


Cytogram 2. Správné nastavení PMT napětí pro FL-2 (vertikální) a FL-1 (horizontální) pro nezjištěný vzorek.

- 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).



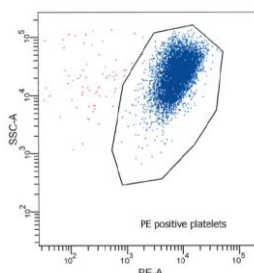
Cytogram 3. Kompenzace R-PE (FL-2, vertikální) signálu z FL-1 (horizontální) kanálu.



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

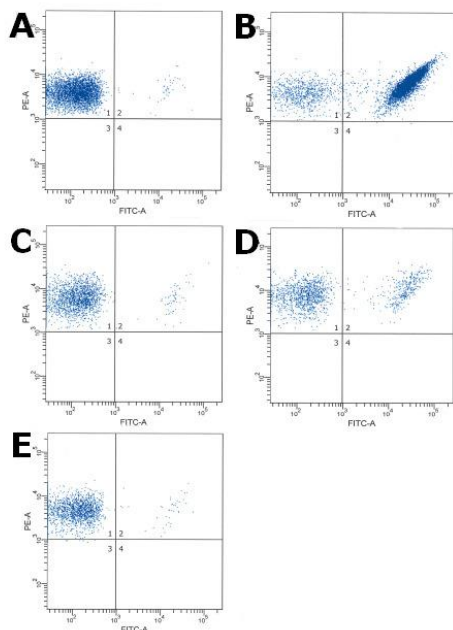
- Po výběru pozitivních markrů krevních destiček (FL-2) mohou být vzorky analyzovány pomocí SSC/ FL-2 bodového grafu. Ujistěte se, že jste také zvolili pozitivní pomocné částice. Jedná se o částice trombocytů, které se tvoří po aktivaci krevních destiček.

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. Výsledky by měly být interpretovány vždy ve spojení s klinickými nálezy, nebo jinými sérologickými testy.

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 rozpuštění 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.

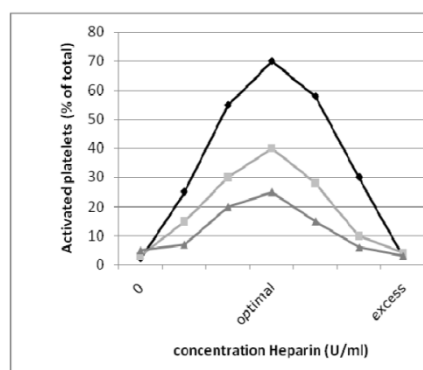
Z tabulky 3 existují výjimky:

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]

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. Laboratoř 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

Analytické hodnocení

Protilátka použitá v tomto testu byla klasifikována v Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA) Workshop. Výsledky interních studií dále prokázaly vysokou citlivost a přesnost testu

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 známé 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 specificitou (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.

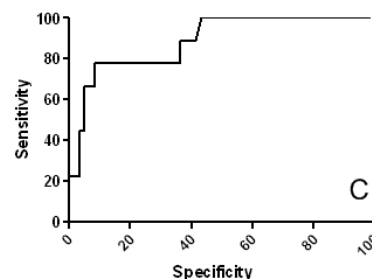
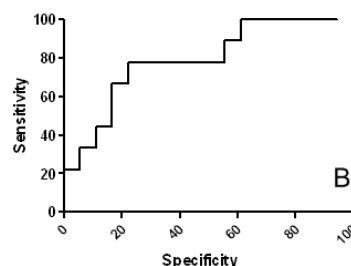
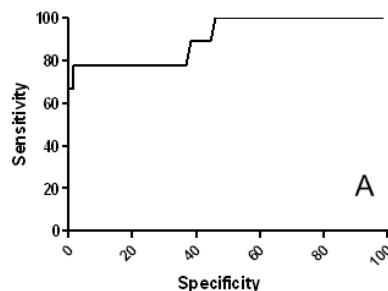
Křivka (ROC) ukazuje, že nejlepší mezní hodnotou pro rozlišení pozitivních a negativních vzorků je 8 %. Na této úrovni dokáže test rozlišit skupiny bez HIT a s diagnózou HIT so 78% senzitivitou (95% interval spolehlivosti 40 - 97 %) a specificitou 98 % (95% interval spolehlivosti 91 - 100 %). Stejná 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 specificitu 100 % při porovnání průtokové cytometrie se SRA.

Při hranici 5 % aktivace je citlivost 78 % (95% interval spolehlivosti: 40 % až 97 %) a specificita 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).

Regulační status

V současné době je sada HITAlert™ registrována jako „in vitro diagnostický zdravotnický prostředek“ v Peru, Švýcarsku, Spojeném království a zemích, které patří do Evropského společenství. Ve všech ostatních zemích by měl být označen jako „pouze pro výzkumné použití“.

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 popsaneho 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, Kremsmuenster, Rakousko
www.vacurette.gbo.com

Vysvětlení použitých symbolů

	Postupujte dle pokynu použití
	Katalogové číslo
	Dostatečný pro
	In vitro diagnostická zdravotnická
	Zařízení
	Pozor, přečtěte si přiložený dokument
	Biologická rizika
	Omezení teploty (°C)
	Pouze pro výzkumné účely
	Sériové číslo
	Použijte do rrrr-mm-dd
	Výrobce
	Oprávněný zástupce v ES
	Conformité Evropské (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

© 2023 - Produkty IQ bv. Všechna práva vyhrazena. Žádná část těchto děl nesmí být reprodukována v žádné formě bez písemného povolení.

Current version + release date	Version 6 29-03-2023 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 5
Changes	Added 'Regulatory status' and removed separate sentence about IVD registration.
Justification	Better overview of IVD registrations.
Current version + release date	Version 5 March 2023 (MM-YYYY)
Previous version	Version 4
Changes	Added CH-REP name and address.
Justification	Mentioning the name and address of the CH-REP is required for registration of this product in Switzerland. Since registration is only applicable for Switzerland, this information has not been added to the Czech version.
Current version + release date	Version 4 17-03-2022 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 3
Changes	Added UKCA label and UKRP address to the English version only.
Justification	This product has officially been registered at the MHRA in the UK as consequence of the Brexit. Since registration is only applicable for the UK, this information has not been added to non-English translations.
Current version + release date	Version 3 01-09-2021 (DD-MM-YYYY)
Previous version	Version 2
Changes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Intended use updated, SDS reference to SDS on IQ website and change control. 2. deleted 'Results should be used in conjunction with clinical findings or other serological tests.' 3. The old package insert was separated into a booklet version (included with every kit) and a web version. The booklet version includes English, German and Czech. 4. Added 'Diagnosis of Heparin Induced Thrombocytopenia (HIT) by flow cytometry' to cover sheet. 5. Reference to web booklet with additional languages
Justification	<ol style="list-style-type: none"> 1. IVDR 2017/746 requirements 2. Deleted because the sentence was already in the text 3. Environmental reasons 4. In line with other Package Inserts of IQ Products. 5. Environmental reasons