



## ZYMUTEST HIA IgGAM Ref RK040D (96 tests)

Dosage qualitatif pour la détection des anticorps héparine-dépendants globaux (Isotypes IgG, IgM et IgA) par ELISA.

Français, dernière révision : 02-2021

### UTILISATION :

Le coffret ZYMUTEST HIA IgGAM est un test ELISA optimisé pour la recherche et le dosage qualitatif des anticorps héparine dépendants globaux d'isotype IgG ou IgM ou IgA, utilisable sur plasma humain ou sérum, ou tout autre milieu biologique où ces anticorps doivent être recherchés.

### RESUME ET EXPLICATION :

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

### PRINCIPE :

Le plasma ou le sérum dilué à tester est introduit dans l'un des puits de la plaque sensibilisée, en présence de lysat plaquettaire. Les anticorps héparine dépendants, de type IgG, IgM et IgA, quand ils sont présents, forment un complexe avec l'héparine non fractionnée, biologiquement disponible, immobilisée et saturée. Après lavage, les anticorps ainsi fixés sont révélés par l'immunoconjugué, constitué d'anticorps polyclonaux de chèvre spécifiques du fragment Fc $\gamma$  de l'IgG humaine,  $\mu$  de l'IgM humaine, et  $\alpha$  de l'IgA humaine et couplés à la peroxydase (HRP). Cet immunoconjugué réagit spécifiquement avec les anticorps héparine dépendants de type IgG, M ou A. Après lavage, le substrat, 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine (TMB) en présence d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), est introduit dans les puits et une coloration bleue se développe. L'arrêt de la réaction par l'acide sulfurique fait virer la coloration au jaune. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'anticorps héparine dépendants de type IgG, IgM ou IgA présente dans l'échantillon testé.

### REACTIFS :

- COAT : Microplaque ELISA (Micro ELISA plate)**, contenant 12 barrettes de 8 puits, sensibilisée par de l'héparine non fractionnée, biologiquement disponible, saturée, stabilisée, et emballée dans un sachet aluminium en présence d'un déshydratant.
- SD** : 2 flacons de 50 mL de diluant échantillon pour les tests HIA (HIA Sample Diluent), prêt à l'emploi. Contient de l'azide de sodium.
- CA** : 3 flacons de contrôle positif lyophilisés (HIA Positive control). A reconstituer par 1 mL de diluant échantillon, afin d'obtenir le contrôle positif prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100). La réactivité attendue (DO<sub>450</sub>) est indiquée sur le papillon fourni dans le coffret.
- CC** : 3 flacons de contrôle négatif (Negative control), lyophilisés, contenant du plasma humain normal dilué. Après reconstitution avec 1 mL de diluant échantillon, le contrôle négatif est prêt à l'emploi (déjà dilué au 1/100). Contient de la BSA.
- CLY** : 3 flacons de lysat cellulaire, lyophilisés. A reconstituer par 2 mL d'eau distillée, afin d'obtenir le réactif prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- IC** : 3 flacons d'immunoconjugué (Anti-(h)-IgG (Fc $\gamma$ )-(h)-IgM( $\mu$ )-(h)-IgA( $\alpha$ )-HRP immunoconjugate), anticorps polyclonaux de chèvre, spécifiques de la partie Fc $\gamma$  de l'IgG,  $\mu$  de l'IgM et  $\alpha$  de l'IgA humaine, couplés à la peroxydase et lyophilisés. L'immunoconjugué prêt à l'emploi est obtenu après reconstitution par 7,5 mL de diluant pour immunoconjugué (CD). Contient de la BSA.
- CD** : 1 flacon de 25 mL de diluant pour immunoconjugué (Conjugate Diluent), prêt à l'emploi. Contient de la BSA.
- WS** : 1 flacon de 50 mL de solution de lavage (Wash Solution), 20 fois concentrée.
- TMB** : 1 flacon de 25 mL de substrat peroxyde : 3,3',5,5' - Tetraméthylbenzidine, contenant de l'eau oxygénée, prêt à l'emploi.
- SA** : 1 flacon de 6mL d'acide sulfurique 0.45M (Stop Solution), prêt à l'emploi.

Le réactif SD contient de faibles quantités d'azide de sodium (0.9 g/L) et le réactif SA contient de l'acide sulfurique, voir MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS.

### MISE EN GARDE ET AVERTISSEMENTS :

- Tout produit d'origine biologique doit être manipulé avec toutes les précautions nécessaires, et considéré comme étant potentiellement infectieux.
- L'azide de sodium peut générer des composants explosifs au contact des canalisations en plomb ou en cuivre.
- Si le substrat TMB devient jaune, cela indique une contamination. Le flacon doit être jeté et un nouveau utilisé.
- L'élimination des déchets doit être effectuée conformément aux réglementations locales en vigueur.
- Utiliser uniquement les réactifs d'un même lot de coffret. Ne pas mélanger les réactifs de différents lots de coffrets pour réaliser un dosage, ils sont optimisés pour chaque lot de coffrets.
- Les réactifs doivent être manipulés avec précautions afin d'éviter toute contamination lors de leur utilisation. Eviter autant que possible toute évaporation des réactifs lors de leur utilisation, en limitant la surface d'échange liquide-air.
- Pour conserver la stabilité des réactifs, refermer les flacons après chaque utilisation avec leurs bouchons respectifs.
- Les études de vieillissement, réalisées à 30°C pendant 3 semaines, montrent que les réactifs peuvent être expédiés à température ambiante pendant une période courte, sans aucun dommage.
- Le plasma bovin utilisé pour la préparation de la BSA a été testé par des méthodes enregistrées et est certifié exempt de maladies infectieuses, notamment de l'encéphalopathie spongiforme bovine.
- L'acide sulfurique, même dilué à 0,45 M, est caustique. Comme pour tout réactif chimique semblable, manipuler l'acide sulfurique avec précaution, en particulier en utilisant des gants et en portant des lunettes de protection. Eviter tout contact avec la peau et les yeux.
- Pour usage de diagnostic *in vitro*.

**CD, WS :** H317 : Peut provoquer une allergie cutanée.

### PREPARATION ET STABILITE DES REACTIFS :

Ramener le coffret à température ambiante, au moins 30 min avant le dosage. Conserver les réactifs non utilisés à 2-8°C. Retirer délicatement le bouchon de lyophilisation des réactifs lyophilisés, pour s'affranchir de toute perte du produit à l'ouverture du flacon.

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

- COAT (Micro ELISA plate)** : Ouvrir le sachet aluminium et sortir le nombre de barrettes de 8 puits nécessaire pour la série de dosages à effectuer. Les barrettes sorties du sachet aluminium doivent être utilisées dans les 30 minutes. Les barrettes non utilisées peuvent être conservées jusqu'à 8 semaines dans leur emballage d'origine, hermétiquement refermé, en présence du déshydratant, à l'abri de l'humidité, à 2-8°C, dans le sachet plastique minipig fourni.

- SD (HIA Sample Diluent)** : Prêt à l'emploi. Ce réactif contient de l'azide de sodium. La stabilité du réactif, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 8 semaines à 2-8°C.
- C+ (Contrôle positif HIA)** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 1 mL de « HIA-Sample-Diluent », agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Le contrôle positif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma contenant des anticorps héparine dépendants d'isotype IgG, IgM, ou IgA déjà dilué au 1/100. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 2 semaines à 2-8°C.
  - 2 mois congelé à -20°C ou moins.
- C- (Negative Control)** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 1 mL de « HIA-Sample-Diluent », agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Le contrôle négatif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi et correspond à un plasma humain normal déjà dilué au 1/100. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 2 semaines à 2-8°C.
  - 2 mois congelé à -20°C ou moins.
- CLy (Cell lysate)** : Reconstituer chaque flacon avec exactement 2 mL d'eau distillée, agiter vigoureusement jusqu'à dissolution complète. Le réactif ainsi reconstitué est prêt à l'emploi. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 2 semaines à 2-8°C.
  - 2 mois congelé à -20°C ou moins\*
- IC (Anti-(h)-IgG(Fc $\gamma$ )-(h)-IgM( $\mu$ )-(h)-IgA( $\alpha$ )-HRP immunoconjugate)** : Reconstituer chaque flacon d'immunoconjugué avec exactement 7.5 mL de « Conjugate Diluent » au moins 15 minutes avant utilisation. Laisser la galette se dissoudre et agiter délicatement pour homogénéiser. La stabilité du réactif après reconstitution, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 4 semaines à 2-8°C.
  - 24 heures à température ambiante (18-25°C).
  - 2 mois congelé à -20°C ou moins\*
- CD (Conjugate Diluent)** : Prêt à l'emploi. Ce réactif contient 0.05% de Kathon CG. Après ouverture, la stabilité du réactif exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 8 semaines à 2-8°C.
- WS (Wash Solution)** : Incuber, si nécessaire, le flacon dans un bain-marie à 37°C jusqu'à dissolution totale des cristaux. Agiter le flacon et diluer la solution de lavage au 1/20 en eau distillée (Les 50 ml de solution concentrée permettent de préparer 1 litre de solution de lavage après dilution). La stabilité de la solution de lavage, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 8 semaines à 2-8°C.
 La stabilité de la solution de lavage diluée, exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - Une fois ouvert, 7 jours à 2-8°C.
- TMB** : Prêt à l'emploi. Après ouverture, la stabilité du réactif exempt de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 8 semaines à 2-8°C.
- SA (Stop Solution)** : Solution stop contenant 0,45M d'acide sulfurique, prête à l'emploi. La stabilité du réactif après ouverture, sous réserve de toute contamination ou d'évaporation, conservé dans son flacon d'origine est de :
  - 8 semaines à 2-8°C.

### CONDITIONS DE STOCKAGE :

Les réactifs non ouverts doivent être conservés à 2-8°C dans leur emballage d'origine. Ils sont alors utilisables jusqu'à la date de péremption imprimée sur le coffret.

### REACTIFS ET MATERIELS REQUIS MAIS NON FOURNIS :

#### Réactifs :

- Eau distillée.

#### Matériels :

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

### PRELEVEMENTS ET PREPARATION DES ECHANTILLONS :

La préparation et la conservation des échantillons doivent être réalisées selon les recommandations locales en vigueur (pour les Etats-Unis, se référer aux recommandations du CLSI GP44-A4 pour plus d'informations concernant le prélèvement, la manipulation et la conservation).

#### Echantillons :

Plasma humain obtenu à partir de sang anticoagulé (citrate trisodique). L'utilisation de plasma provenant de sang prélevé sur EDTA est possible. Les conditions de conservation sont les mêmes qu'avec le plasma citraté. L'utilisation de sérum est possible pour la recherche des anticorps héparine dépendants. Le sérum est alors préparé de manière habituelle pour les dosages de laboratoire. Décanter le sérum du caillot avant utilisation ou congélation. Les conditions de conservation sont identiques à celles du plasma.

#### Prélèvement :

Le sang (9 volumes) doit être collecté sur du citrate trisodique (1 vol) (0.109M) avec précautions, par ponction veineuse franche. Le premier flacon doit être éliminé.

#### Centrifugation :

Dans les deux heures, utiliser une méthode validée au sein du laboratoire permettant d'obtenir un plasma pauvre en plaquettes, par exemple un minimum de 15 minutes à 2500 g à température ambiante (18-25°C), et le plasma doit décanter dans un tube plastique.

#### Conservation du plasma :

- 24 heures à température ambiante (18-25°C)
- 6 mois à -20°C.

Les échantillons de plasma congelé doivent être décongelés rapidement à 37°C, puis agités soigneusement et testés dans les 72 heures. Après décongélation et avant utilisation, agiter vigoureusement afin de resuspendre tout précipité.

## PROCEDURE :

### Méthode de dosage :

1. Les contrôles sont prêts à l'emploi (déjà dilués au 1/100).

2. les échantillons sont dilués dans du tampon SD comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Echantillons	Dilution
Plasma	1/100
Sérum	1/100
Liquide biologique	1/100

En présence d'échantillons avec un taux très élevé d'anticorps héparine dépendants, diluer au 1/200 ou au 1/400. Les résultats obtenus devront alors être multipliés par 2 ou 4.

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

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

### Remarques :

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

### VALIDATION :

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

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

$$N = DO_{450} \text{ pour Contrôle Négatif} : < 0.30$$

Les valeurs obtenues pour P et N, à 20±1°C, sont indiquées pour chaque lot de réactif dans le papillon inclus dans le coffret.

Les DO<sub>450</sub> obtenues peuvent varier en fonction de la température réelle à laquelle est effectuée le dosage.

### RESULTATS :

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

### INTERPRETATIONS DES RESULTATS :

Lorsque la réaction est réalisée à 20±1°C, les résultats suivants sont obtenus :

Positif :	DO > 0.50
Négatif :	DO ≤ 0.50

Lorsque la température ambiante n'est pas comprise dans l'intervalle de température recommandé, les valeurs d'absorbances obtenues peuvent être affectées. Le contrôle positif peut alors être utilisé pour ajuster la valeur seuil. Le papillon fourni dans le coffret indique la DO<sub>450nm</sub> obtenue pour le contrôle positif du lot ZYMUTEST HIA utilisé, et la valeur en % de cette DO<sub>450nm</sub> correspondant à la valeur seuil. La valeur seuil ajustée est alors le pourcentage correspondant de la valeur de DO<sub>450</sub> mesurée pour le contrôle positif dans la série réalisée.

### LIMITATIONS :

- Pour obtenir les performances optimales du test et répondre aux spécifications, suivre scrupuleusement les instructions techniques validées par HYPHEN BioMed. Il est de la responsabilité du laboratoire de valider toutes les modifications apportées à ces instructions d'utilisation.
- Tout réactif présentant un aspect inhabituel ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Tout plasma présentant ou des signes de contamination doit être rejeté.
- Si les étapes de lavage ne sont pas réalisées correctement, cela peut induire un "bruit de fond" élevé et une valeur trop forte du contrôle négatif. Afin d'éviter tout développement de couleur non spécifique, vérifier que le lavage est efficace et correctement effectué.
- Comme pour toute recherche d'auto-anticorps, la présence d'états inflammatoires ou infectieux, d'immuno-complexes circulants, de gammopathies, de pathologies auto-immunes, peut entraîner une réactivité aspécifique faible dans la zone douteuse ou faiblement positive. Vérifier la présence possible d'anticorps sur un nouvel échantillon.
- Des résultats erronés peuvent se produire en cas de contamination bactérienne des matériaux d'essai, de périodes inadéquates d'incubation, de mauvais lavage ou décantage des puits d'essai,

d'exposition du substrat à la lumière, d'omission de réactifs de test, d'exposition à des températures plus ou moins élevées que celles préconisées ou en d'omission d'étapes.

- Les résultats de cet essai ne doivent pas être utilisés comme seule base pour une prise de décision clinique.
- Bien qu'une réaction positive obtenue par ce test puisse indiquer la présence d'un anticorps héparine-associé, la détection de tels anticorps NE CONFIRME PAS le diagnostic de thrombopénie induite par l'héparine (TIH).
- Certains patients peuvent présenter des anticorps d'origine naturelle anti-PF4 ou anti-chimokines.

### VARIATIONS PATHOLOGIQUES :

Les anticorps héparine dépendants sont des immunoglobulines présentes dans le plasma de patients suspectés de développer une thrombopénie induite par l'héparine (TIH) de type II. La TIH de type II, de nature immunoallergique, survient dans le cadre d'une héparinothérapie<sup>1,2</sup> et reste une complication majeure de ce traitement. Elle est due à l'apparition d'anticorps dirigés contre un complexe macromoléculaire Héparine-Protéine (généralement Facteur 4 Plaquettaire, ou PF4)<sup>3,4</sup>. Des anticorps dirigés contre d'autres chimokines comme le neutrophil-activating peptide ou NAP2 et l'interleukine-8 ou IL8 ont aussi été mis en évidence dans le plasma de certains patients<sup>5</sup>. La pathologie semble associée aux anticorps héparine dépendants d'isotype IgG le plus souvent. Toutefois, lorsque le test est utilisé pour le dépistage du risque d'évoluer vers une TIH, le dosage des anticorps globaux IgGAM est particulièrement utile comme facteur de pronostic de cette complication. Lorsque la TIH apparaît dans un premier temps, des phénomènes inflammatoires et/ou d'activations plaquettaires relatives aux différents contextes médicaux et chirurgicaux, se développent et augmentent la libération de chimokines, ce qui favorise la formation de complexes héparine-chimokines (généralement PF4). Ces complexes de grande taille sont antigéniques et induisent la synthèse d'anticorps héparine dépendants. La grande hétérogénéité de ces anticorps pourrait expliquer en partie certaines discordances existant entre la clinique indiscutable suggérant le diagnostic de TIH et les examens biologiques<sup>6</sup>. Les anticorps héparine dépendants peuvent être fréquemment asymptomatiques, en particulier lorsqu'ils sont d'isotype IgM. L'association clinique est plus forte avec des concentrations élevées d'anticorps, et avec l'isotype IgG.

### APPLICATIONS :

- Suspicion clinique de TIH durant un traitement à l'héparine (nécrose de la peau, chute du taux plaquettaire  $<100 \cdot 10^9$  G/L ou diminution de plus de 30% entre deux numérations successives...). D'autres causes possibles de thrombopénie devront être recherchées et exclues. En présence de thrombopénie, un test positif permet de confirmer le diagnostic.
- Les anticorps héparine dépendants d'isotype IgG sont mieux associés avec le diagnostic clinique de TIH. Le coffret ZYMUTEST HIA IgG (RK040A) offre ainsi une meilleure spécificité de la complication clinique de TIH, mais une sensibilité moindre puisque les cas associés uniquement aux isotypes IgM et/ou IgA ne sont pas détectés.

### TESTS ASSOCIES :

Les divers isotypes peuvent être recherchés spécifiquement, avec le coffret ZYMUTEST HIA IgG, IgA, IgM (RK040E), qui permet un isotypage complet des anticorps héparine-dépendants. Ce coffret présente un intérêt particulier pour toute étude de recherche ou prospective sur le développement de TIH durant un traitement à l'héparine.

### CONFIRMATION DES ECHANTILLONS POSITIFS (SI NECESSAIRE) :

Si nécessaire, les échantillons testés positifs peuvent être confirmés par l'inhibition de la fixation des anticorps en présence d'héparine. Pour cela, à 500µL de l'échantillon testé (plasma ou sérum) dilué au 1/100, ajouter 10µL d'une solution d'héparine non fractionnée à 100 UI/mL, et homogénéiser. Cette solution héparinée (2 UI/mL final) doit alors être testée avec le coffret. La fixation d'anticorps héparine-dépendants sur la plaque sensibilisée est alors fortement inhibée (diminution de l'absorbance de plus de 50%) dans la plupart des cas. Cette inhibition confirme la fixation héparine-dépendante des anticorps.

Dans de très rares échantillons, déjà positifs en l'absence de lysat plaquettaire, cette inhibition n'a pas été observée, et le test reste positif avec ou sans héparine dans le diluant: le résultat (qui reste incompris au vu des connaissances actuelles) doit alors être considéré comme non concluant et interprété avec d'autres analyses ou des critères pour le diagnostic de HIT.

### PERFORMANCES :

- Pas d'interférences de l'héparine jusqu'à 1 UI/mL.
- Etude interne: Zymutest IgGAM versus Asserachrom pour n=44 échantillons plasma.

		Asserachrom	
		Positif	Négatif
Zymutest IgGAM	Positif	28	2
	Négatif	0	14
	En accord	100%	88%

- Etude externe sur deux sites: Zymutest IgGAM versus Asserachrom pour n=243 échantillons plasma.

		Asserachrom	
		Positif	Négatif
Zymutest IgGAM	Positif	48	32
	Négatif	27	136
En accord		76%	
Co-positif		64%	
Co-négatif		81%	
Taille de l'échantillon		243	

- Etude externe sur trois sites: Zymutest IgGAM versus GTI PF4 Enhanced pour n=345 échantillons plasma.

Combinés Sites 1,2,3		GTI PF4-Enhanced	
		Positif	Négatif
Zymutest IgGAM	Positif	101	17
	Négatif	74	153
En accord		73,62%	
Co-positif		57,71%	
Co-négatif		90,00%	
Taille de l'échantillon		345	

- Exemple de reproductibilité:

Echantillons	Intra essais			Inter essais		
	N	A450	CV%	N	A450	CV%
IgGAM Control Positif	9	1.74	4.75	7	1.84	7.50

### REFERENCES :

- Gruel Y. *et al.* Thrombopénie induite par les héparines manifestations cliniques et physiopathologie. Presse Med. 1998.
- Warkentin TE *et al.* Heparin induced thrombocytopenia in patient treated with low molecular weight heparin or unfractionated heparin. N eng J Med 1995.
- Amiral J *et al.* Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin induced thrombocytopenia : Thromb haemost, 1992
- Amiral J *et al.* Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin induced thrombocytopenia : a study of 44 cases. Thromb Haemost 1995.
- Amiral J *et al.* Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin associated thrombocytopenia. Blood. 1996.
- Elalamy *et al.* Diagnostic et gestion des thrombopénies induites par l'héparine. Rev Mal Respir. 1999.
- Warkentin TE *et al.* Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. Transfus Med Rev. 2006.
- Greinacher A *et al.* Heparin induced thrombocytopenia: frequency and pathogenesis. Pathophysiol Haemost Thromb. 2006.
- CLSI Document GP44-A4: "Procedures for the handling and processing of blood specimens for common laboratory tests".

### SYMBOLIS :

Symboles utilisés et signes énumérés dans la norme ISO 15223-1, se référer au document Définition des symboles.

Changement par rapport à la précédente version.