



**Lateral Flow Immunoassay to detect
IgG antibodies against PF4/polyanion-complexes
English: Page 1-6**

Lateralfuss-Immunoassay zum Nachweis von IgG Antikörpern gegen
PF4/Polyanion-Komplexe
Deutsch: Seite 7-12

REF:

MQHIT 1 (Z)



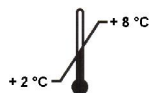
20 (5)








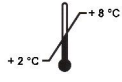



Milenia Biotec GmbH
Versailler Str. 1
D-35394 Gießen
Germany



Tel.: +49-641-94 8883-0
Fax: +49-641-94 8883-80
E-mail: info@milenia-biotec.de
<http://www.milenia-biotec.de>



Symbols (E) Symbole (D)	Explanation Erklärung	Symbols (E) Symbole (D)	Explanation Erklärung
	Use by Verwendbar bis		Contains sufficient for Inhalt ausreichend für
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device <i>In-vitro</i> Diagnostika		Manufacturer Hersteller
	Batch code Chargenbezeichnung		For IVD performance evaluation only Nur zur IVD Leistungsbewertung
REF	Catalogue number Katalognummer		Consult Instructions for use Gebrauchsanweisung beachten
	Storage conditions Lagerungsbedingungen		Consult attended documents Begleitdokumente beachten

For further languages please visit: www.milenia-biotec.de or send an email to: info@milenia-biotec.de

Warnings and Precautions

- Read **these instructions** carefully before performing the test. Follow them step by step!
- Store reagents at 2 - 8° C!
- Do not use the kit after expiration date!
- Do not use test unit if foil pouch is damaged!
- Protect test units from moisture!
- Do not interchange components of packages of different batch codes!
- All samples, used units, pipettes, tips, and other contaminated material should be handled carefully and as potentially infectious.
- For professional users.

Materials Supplied, Storage and Stability

REF: MQHIT 1					
Component	Cat.-No.	Content	Preparation	Storage at	Shelf life
HIT Test Unit; membrane coated with polyclonal (goat) anti-human IgG antibodies, anti-ligand antibodies conjugated to gold particles	MQSHIT	20	ready to use	2 - 8 °C Use immediately after opening the foil pouch!	in the <u>closed</u> foil pouch until expiration date
Sample Buffer, Buffer, pH 7.4	MQBHIT	1 vial à 2 mL (white)	ready to use	2 - 8 °C	until expiration date
MQHIT 1: This bag contains 20 Evaluation Cards					

REF: MQHIT Z					
Component	Cat.-No.	Content	Preparation	Storage at	Shelf life
HIT Test Unit; membrane coated with polyclonal (goat) anti-human IgG antibodies, anti-ligand antibodies conjugated to gold particles	MQSHIT	5	ready to use	2 - 8 °C Use immediately after opening the foil pouch!	in the <u>closed</u> foil pouch until expiration date
Sample Buffer, Buffer, pH 7.4	MQBHITZ	1 vial à 0.5 mL (white)	ready to use	2 - 8 °C	until expiration date
MQHIT Z: This bag contains 5 Evaluation Cards					

Material Safety Data Sheets are available on request (look as well www.milenia-biotec.de).

Intended Use

- For *in vitro* diagnostic use.
- Milenia® QuickLine HIT is designed for qualitative detection of IgG antibodies against PF4/polyanion-complexes.

Materials Required But Not Supplied

Pipet and tips: 5 µL (serum)

Specimen Collection and Preparation

Serum
Avoid hemolysis; separate serum from blood cells within two hours

Volume Required

Serum: 5 µL

Summary and Explanation

Heparin induced thrombocytopenia (HIT) is a life-threatening disease associated with exposure to unfractionated or (less commonly) low-molecular-weight heparin, drugs which are used very frequently for various indications. HIT II occurs in up to 5 % of patients on heparin. This prevalence varies with patient population and the nature of the disease and the type of heparin, thus the anticoagulant. Cardiac and major orthopedic surgeries expose a higher risk than other clinical situations when heparin is used.

HIT is caused by antibodies directed against a complex of platelet factor 4 (PF4) and polyanions such as heparin. The pathogenic and thrombogenic species is immunoglobulin IgG. There is evidence for a correlation between antibody concentration and clinical severity. Platelet activation and massively enhanced thrombin generation promote venous and/ or arterial thromboembolism. The rate of severe patient injury (e.g. amputations) and mortality is very high.

Patients with HIT II require alternative anticoagulation, but the drugs used in this setting have a high rate of hemorrhagic complications. There is no antidote available. Monitoring with standard methods is either not reliable or impossible. On top of this the drug costs are significantly higher than for heparins. Alternative anticoagulants should be reserved for patients with high clinical probability for HIT and with confirmed antibodies. Excluding HIT-antibodies is an important step towards selecting the most appropriate anticoagulation strategy.

Method and Test Principle

The Milenia[®] QuickLine HIT is a lateral flow immunoassay designed for qualitative determination of antibodies against PF4/polyanion-complexes in human serum.

The sample is pipetted in the sample application port of the test unit and the sample buffer is added immediately. The buffer forces the sample to migrate through the membrane of the test unit.

Immobilized anti-human IgG on the nitrocellulose membrane binds patient's IgG-antibodies which are previously captured by the PF4/polyanion-complex which is detected by intensely colored gold nanoparticles.

The presence of PF4/polyanion-complexes becomes visible at a colored test line (T). This test line - if it is positive - has to be the same or a darker shade of color than the given one on the provided evaluation card.

The surplus of gold particles continues to migrate through the membrane and is captured at the control line (C) by specific antibodies. A well visible line appears after incubation time.



References

1. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2009; 7 Suppl 1:9-12. Review.
2. Wilke T, Tesch S, Scholz A, Kohlmann T, Greinacher A. The costs of heparin-induced thrombocytopenia: a patient-based cost of illness analysis. *J Thromb Haemost.* 2009;7(5):766-73
3. Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJ. Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2009;7 (8): 1260-5.
4. Sachs UJ, Manuscript in preparation
5. Warkentin TE, Greinacher A, Koster A, Lincoff AM; American College of Chest Physicians. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest.* 2008 Jun;133(6 Suppl):340S-380S.

Test Performance

Important notes:

- Do not interchange components of different lots!
- The test unit is sensitive to humidity. In case of damaged package do not use test unit!
- Before opening bring the test unit and sample buffer to room temperature (18 – 28 °C).
- Use the test unit immediately after opening. Do not store at room temperature!

	Step	
1.		Pipet 5 µL serum into the sample application port of the test unit.
2.		Add 2 drops sample buffer Note: Do not contaminate the vial with sample material!
3.	Incubation	10 minutes at room temperature (18 - 28°C).
4.	Evaluation (visual)	The result will be evaluated visually by the provided evaluation card: The test is positive if the test line shows the same or a darker shade of color after incubation time than the given line in the evaluation card (s. results interpretation and functional control) The result must be interpreted immediately after incubation time.

Results Interpretation

- **Milenia® QuickLine HIT- Test Line- positive:** An intensely colored line appears on the membrane.
- **Milenia® QuickLine HIT- Test Line- negative:** The test line remains uncolored.
- **Milenia® QuickLine HIT- Control Line- positiv:** The control-line (C) must be colored (s. Function Control).

The interpretation of Milenia® QuickLine HIT can only be evaluated **visually** by the provided **evaluation card**.

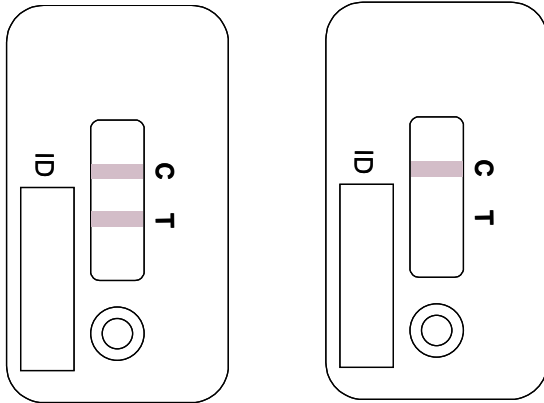
Note: Results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Additionally every decision for therapy should be taken individually.

Function Control

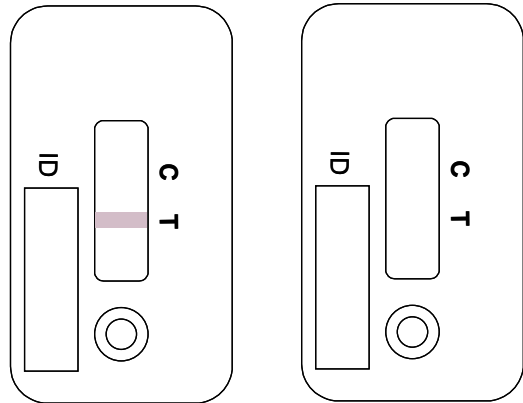
In any case, the Control line (C) has to appear!

It is only used as functional control and can not be used for the interpretation of the test line.
If the control line is not detectable after 10 minutes incubation time, the result is invalid and the analysis has to be repeated with a new test unit!

Valid results



Invalid results



Assay Characteristics

Sample material:	5 μ L serum
Incubation time:	10 minutes at room temperature (18 – 28 °C)
Sensitivity:	100%
Specificity:	93%

Limitation / Interferences

Lipemia, bilirubin, and haemolysis do not show any interference influence on the results.



Lateral Flow Immunoassay to detect
IgG antibodies against PF4/polyanion-complexes
English: Page 1-6

**Lateralfuss-Immunoassay zum Nachweis von IgG Antikörpern
gegen PF4/Polyanion-Komplexe**
Deutsch: Seite 7-12

REF:

MQHIT 1 (Z)



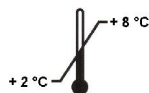
20 (5)








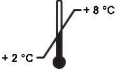



Milenia Biotec GmbH
Versailler Str. 1
D-35394 Gießen
Germany



Tel.: +49-641-94 8883-0
Fax: +49-641-94 8883-80
E-mail: info@milenia-biotec.de
<http://www.milenia-biotec.de>



Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung	Symbols (GB) Symbole (DE)	Explanation Erklärung
	Use by Verwendbar bis		Contains sufficient for Inhalt ausreichend für
	In vitro diagnostic medical device In Vitro Diagnostika		Manufacturer Hersteller
	Batch code Chargenbezeichnung		For IVD performance evaluation only Nur zur IVD Leistungsbewertung
REF	Catalogue number Katalognummer		Consult Instructions for Use Gebrauchsanweisung beachten
	Storage conditions Lagerungsbedingungen		Consult attended documents Begleitdokumente beachten

Sie suchen eine andere Sprache, besuchen Sie uns unter: www.milenia-biotec.de, oder senden Sie eine E-mail an: info@milenia-biotec.de.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

- Diese Gebrauchsanweisung vor der Testdurchführung aufmerksam lesen. Arbeitsschritte beachten!
- Reagenzien bei 2 - 8° C lagern!
- Kit nicht nach dem Verfallsdatum verwenden!
- Die Testeinheiten nicht verwenden, falls der Folienbeutel beschädigt ist!
- Die Testeinheit vor Feuchtigkeit schützen!
- Keine Komponenten aus Testpackungen verschiedener Chargen verwenden.
- Alle Proben, Testeinheiten, Pipetten, Pipettenspitzen und anderes kontaminiertes Material sollten vorsichtig und als potenziell infektiös behandelt werden.
- Für Fachpersonal.

Kitbestandteile, Lagerung und Stabilität

REF: MQHIT 1					
Komponente	Art.Nr.	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit
HIT Testeinheit (HIT Test Unit), Membran, beschichtet mit polyklonalen (Ziege) anti human IgG spezifischen Antikörper, Goldkonjugat mit anti-Ligand-Antikörpern	MQSHIT	20	gebrauchsfertig	2 - 8 °C Sofort nach dem Öffnen des Plastikbeutels verwenden!	im verschlossenen Plastikbeutel bis zum Verfallsdatum
Probenpuffer, pH 7,4 (Sample Buffer)	MQBHIT	1 Fl. à 2 ml (weiß)	gebrauchsfertig	2 - 8 °C	bis zum Verfallsdatum
HIT Auswertekarten (MQHIT 1: This bag contains 20 Evaluation Cards)	MQAHIT	20			

REF: MQHIT Z					
Komponente	Art.Nr.	Inhalt	Vorbereitung	Lagerung	Haltbarkeit
HIT Testeinheit (HIT Test Unit), Membran, beschichtet mit polyklonalen (Ziege) anti human IgG spezifischen Antikörper, Goldkonjugat mit anti-Ligand-Antikörpern	MQSHIT	5	gebrauchsfertig	2 - 8 °C Sofort nach dem Öffnen des Plastikbeutels verwenden!	im verschlossenen Plastikbeutel bis zum Verfallsdatum
Probenpuffer, pH 7,4 (Sample Buffer),	MQBHITZ	1 Fl. à 0,5 ml (weiß)	gebrauchsfertig	2 - 8 °C	bis zum Verfallsdatum
HIT Auswertekarten (MQHIT Z: This bag contains 5 Evaluation Cards)	MQAHITZ	5			

Sicherheitsdatenblätter sind auf Anfrage erhältlich (siehe auch unter www.milenia-biotec.de).

Zweckbestimmung

Für den *in-vitro* Diagnostik Gebrauch.
Milenia® QuickLine HIT ist für den Nachweis von humanen Antikörpern gegen PF4/Polyanion-Komplexe im Serum entwickelt.

Nicht im Lieferumfang enthaltenes Material

Pipette und Pipettenspitzen: 5 µl (Serum)

Probenentnahme und –vorbereitung

Serum
Hämolyse vermeiden; Serum innerhalb von 2 Stunden von den Blutzellen trennen.

Benötigtes Probenvolumen

Serum: 5 µl

Zusammenfassung / Anwendungsbereich

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine lebensbedrohliche Erkrankung. Sie wird durch eine Exposition mit unfraktioniertem oder (seltener) niedermolekularem Heparin hervorgerufen.

Heparin ist ein Medikament, das häufig und für verschiedenste Indikationen eingesetzt wird. Eine HIT II tritt bei bis zu 5% der Patienten unter Heparintherapie auf. Diese Prävalenz variiert mit der Patientenpopulation, und der Art der Erkrankung und dem Typ des Heparins, somit der Antikoagulanstherapie.

Kardiologische- und große orthopädische Eingriffe bergen ein höheres Risiko einer HIT Ausbildung als andere klinische Situationen, in denen Heparin als Antikoagulans eingesetzt wird.

HIT wird verursacht durch Antikörper gegen einen Komplex von Plättchenfaktor 4 und einem Polyanion wie Heparin. Die klinisch relevanten, thrombogenen Antikörper sind IgG Antikörper. Es gibt Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Menge der gebildeten IgG Antikörper und der Schwere des klinischen Erscheinungsbildes.

Eine durch die IgG-Antikörper ausgelöste Thrombozytenaktivierung führt zu vermehrter Thrombinfreisetzung. Dieses führt zu venösen und / oder arteriellen Thromboembolien, trotz Heparinabgabe. Die Folgen einer HIT für den Patienten sind schwerwiegend (z.B. Amputationen), auch die Mortalität ist bei diesen Patienten sehr hoch.

HIT II - Patienten benötigen eine alternative Antikoagulation, aber diese Medikamente beinhalten die Gefahr hämorrhagischer Komplikationen. Es steht kein spezifisches Antidot zur Verfügung. Das Patientenmonitoring bei alternativen Antikoagulanstherapien ist mit standardisierten Methoden entweder nicht möglich oder zu unzuverlässig. Spezifischere Methoden für das Monitoring stehen häufig nicht zur Verfügung. Auch sind die Kosten dieser Medikamente wesentlich höher als für eine Heparintherapie.

Alternative Antikoagulantien müssen bei Patienten mit bestätigter HIT II-Problematik angewandt werden. Aus diesem Grund ist der Ausschluss von klinisch relevanten hit pathogenen Antikörpern ein wichtiger Schritt zur Auswahl der geeigneten Antikoagulation.

Methode und Testprinzip

Der Milenia[®] QuickLine HIT ist ein Lateral Flow Immunoassay zur qualitativen Bestimmung von Antikörpern gegen PF4 /Polyanion-Komplexen in humanem Serum.

Die Probe wird in den Probenauftrag der Testeinheit pipettiert und der Probenpuffer wird sofort hinzugefügt.

Der Puffer strömt mit der Probe durch die Membran der Testeinheit.

Immobilisierte anti-human IgG Antikörper auf der Nitrozellulosemembran binden IgG Antikörper des Patienten, die zuvor an einen PF4/Polyanion-Komplex gebunden wurden und durch intensiv gefärbte Goldnanopartikel detektiert werden.

Die PF4/Polyanion-Komplexe werden als farbige Testlinie (T) sichtbar. Diese Testlinie muss bei positivem Ergebnis den gleichen oder einen dunkleren Farbton aufweisen, als auf der beigefügten Auswertekarte vorgegeben ist.

Der Überschuss an Goldpartikeln fließt weiter durch die Membran bis zur Kontroll-Linie (C). Dort sind Konjugat-spezifische Antikörper aufgebracht. Die Goldpartikel werden von diesen Antikörpern gebunden. Nach der Inkubationszeit erscheint eine gut sichtbare farbige Linie.

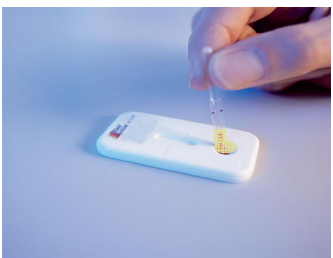

Referenzen

1. Greinacher A. Heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2009; 7 Suppl 1:9-12. Review.
2. Wilke T, Tesch S, Scholz A, Kohlmann T, Greinacher A. The costs of heparin-induced thrombocytopenia: a patient-based cost of illness analysis. J Thromb Haemost. 2009;7(5):766-73
3. Bakchoul T, Giptner A, Najaoui A, Bein G, Santoso S, Sachs UJ. Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2009;7 (8):1260-5.
4. Sachs UJ, Manuskript in Vorbereitung
5. Warkentin TE, Greinacher A, Koster A, Lincoff AM; American College of Chest Physicians. Treatment and prevention of heparin-induced thrombocytopenia: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). Chest. 2008 Jun;133(6 Suppl):340S-380S.

Testdurchführung

Vorbereitung

- Die Komponenten einzelner Chargen dürfen nicht ausgetauscht werden!
- Die Testeinheit ist empfindlich gegenüber Feuchtigkeit. Bei Beschädigung des Folienbeutels Testeinheit nicht verwenden.
- Testeinheit und Probenpuffer vor dem Öffnen auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) bringen!
- Testeinheit niemals bei Raumtemperatur lagern! Testeinheit unmittelbar nach dem Öffnen verwenden!

	Schritte	
1.		5 µl Serum in den Probenauftrag der Testeinheit pipettieren.
2.		2 Tropfen Probenpuffer zugeben. Hinweis: Eine Kontamination der Flasche mit Probenmaterial vermeiden.
3.	Inkubation	10 Minuten bei Raumtemperatur (18 - 28 °C)
4.	Auswertung (visuell)	Der Test wird visuell mit der beiliegenden Auswertekarte abgelesen: Der Test ist positiv, wenn die Testlinie nach der Inkubationszeit den gleichen oder einen stärkeren Farbton aufweist als auf der Auswertekarte vorgegeben. (s. Interpretation d. Ergebnisse und Funktionskontrolle) Die Ergebnisse müssen sofort nach Ablauf der Inkubationszeit beurteilt werden!

Interpretation der Ergebnisse

- **Milenia® QuickLine HIT- Test Linie- positiv: Eine intensiv gefärbte Linie wird auf der Membran sichtbar.**
- **Milenia® QuickLine HIT- Test Linie- negativ: Die Membran zeigt an dieser Stelle keine gefärbte Linie.**
- **Milenia® QuickLine HIT- Kontroll- Linie- positiv: Die Kontroll-Linie (C) muss angefärbt sein (s. Funktionskontrolle).**

Die Auswertung des Milenia® QuickLine HIT Tests kann nur **visuell** mit der beiliegenden **Auswertekarte** erfolgen.

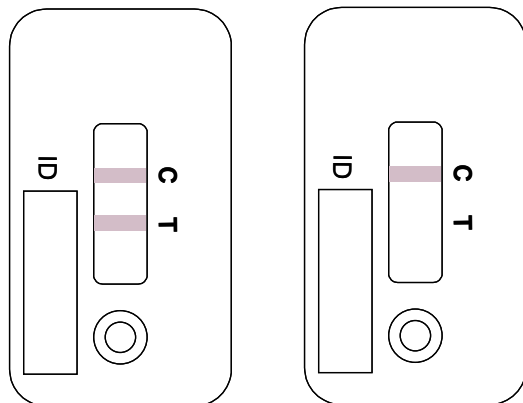
Hinweis: Die Ergebnisse sollten anhand des gesamten klinischen Status des Patienten überprüft werden. Jede Entscheidung zur Therapie muss individuell getroffen werden.

Funktionskontrolle

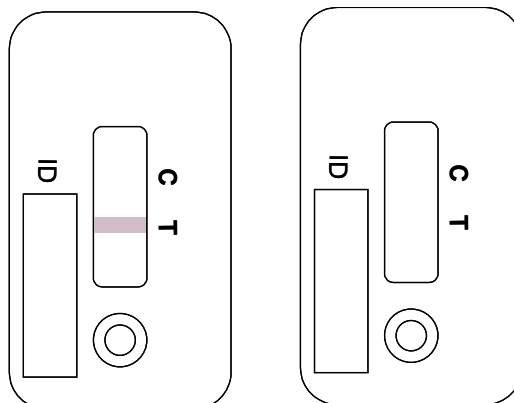
Die Kontroll-Linie (C) muss immer sichtbar werden!

Sie dient nur als Funktionskontrolle und kann nicht zur Beurteilung der Farbintensität der Testbande herangezogen werden. Wenn die Kontroll-Linie nach der 10 minütigen Inkubationszeit nicht sichtbar ist, ist das Ergebnis ungültig und der Test muss mit einer neuen Testeinheit wiederholt werden!

Gültige Ergebnisse



Ungültige Ergebnisse



Testcharakteristika

Probenmaterial:	5 µl Serum
Inkubationszeit:	10 Minuten bei Raumtemperatur (18 – 28 °C)
Normalbereich:	negativ
Sensitivität:	100%
Spezifität:	93%

Testlimitation / Störeinflüsse

Lipämie, Bilirubin und Hämolyse haben keinen Einfluss auf die Ergebnisse.