

HYALURONIC ACID (HA) TEST KIT

For *In Vitro* Diagnostic Use

INTENDED USE

An enzyme-linked binding protein assay for the determination of hyaluronic acid (HA) in human serum or plasma. HA is intended for use as a serologic marker of liver fibrosis to be used in conjunction with other histological, clinical and serological information for predicting advanced fibrosis (Metavir F3-4) in patients with chronic liver disease associated with non-alcoholic steatohepatitis (NASH).

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE ASSAY

Hyaluronic acid (HA), also known as hyaluronate or hyaluronan, is a glycosaminoglycan - a high molecular weight polysaccharide with an unbranched backbone composed of alternating sequences of β -(1-4)-glucuronic acid and β -(1-3)-N-acetylglucosamine moieties. Each dimer is referred to as one unit which has a molecular weight of approximately 450 D. The HA molecule can vary in length from less than 10 to more than 1,000 units.¹⁻⁴ HA is mainly produced by fibroblasts and other specialized connective tissue cells. It plays a structural role in the connective tissue matrix (proteoglycan) as well as in various cell-to-cell interactions. HA is widely distributed throughout the body and can be found as a free molecule in plasma and synovial fluid. In plasma, the half-life of the HA molecule has been estimated to be about 5-6 minutes.^{3,4} HA is found in high concentrations in synovial fluid and is responsible for normal water retention and lubrication of the joint. Synovial HA may pass into plasma via the lymphatic system.⁵ In circulation, HA levels are maintained by an efficient receptor-dependent removal mechanism present in sinusoidal endothelial cells (SEC) of the liver and by the enzymatic action of hyaluronidase.^{6,7}

Serum HA levels can be elevated in various liver diseases characterized by liver fibrosis and cirrhosis, due to decreased hepatic removal and/or increased hepatic production of HA during liver inflammation.^{8,9} Increased HA levels have shown a better correlation with the degree of histopathological damage to the liver than conventional liver function tests including ALT/AST, alkaline phosphatase and bilirubin.^{10,11} It has been proposed that the determination of serum HA levels may be useful in distinguishing cirrhotic from non-cirrhotic liver, for assessing the degree of liver fibrosis, and for monitoring liver function.¹²⁻¹⁶ It has also been shown that HA levels reflect the extent of hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C and may be useful in monitoring the response to interferon alpha treatment¹⁷⁻¹⁹ Similar correlation has been found in patients with alcoholic cirrhosis²⁰ and primary biliary cirrhosis.¹⁰ HA levels have also been shown to be an early marker of liver damage from toxic agents such as ethanol, acetaminophen, and bacterial lipopolysaccharide, as pathological changes of the SEC in response to these agents precede pathological changes of the hepatocytes.^{13,21}

NASH is a type of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) with an estimated prevalence of 3 – 5% in the general population. It is defined as the presence of hepatic steatosis and inflammation with hepatocyte injury (ballooning) with or without fibrosis.³⁰ Clinical data suggests that elevated HA levels are seen in NASH patients with liver fibrosis.²⁴

PRINCIPLE OF THE TEST

The HA Test Kit measures HA levels and is performed as an enzyme-linked binding protein assay that uses a capture molecule known as the hyaluronic acid binding protein (HABP).^{22, 23, 25} HABP functions as a specific receptor for HA and *in vivo* links HA with the core-protein and other glycosaminoglycans to form proteoglycan aggregate complexes. In this assay, naturally occurring HABP is isolated by affinity purification from bovine nasal cartilage and coated to microwells to specifically capture HA. An enzyme-conjugated version of HABP is also used to measure the HA captured from the human serum or plasma by the HABP coated microwells.²⁸⁻²⁹ HABP is bound, blocked, and stabilized to the bottom and sides of the wells of a microtiter plate. Diluted patient serum or plasma samples are incubated in the wells, allowing any available HA to bind to the immobilized HABP. The plates are then rinsed of any nonbound serum or plasma molecules. Bound HA is quantitated using a second HABP molecule conjugated to an enzyme (horseradish peroxidase). Any unbound conjugated HABP is then rinsed away. Bound conjugated HABP is incubated with a substrate/chromophore system. The final color development is measured spectrophotometrically in optical density units (OD units). HA concentrations of patient serum or plasma are determined from a reference curve resulting from OD units of five HA reference samples of known HA concentration and 0 ng/mL (reagent blank).

REAGENTS

Store at 2 - 8°C. Do Not Freeze.


Each HA 96-microwell Test Kit contains the following reagents (volumes may vary depending on kit size and configuration):

- 12 stabilized HAP-coated 8-well microwell strips with frame.
- 1 bottle (57 mL) Reaction Buffer (blue solution).
- 1 vial (0.5 mL) 50 ng/mL HA Reference Solution.
- 1 vial (0.5 mL) 100 ng/mL HA Reference Solution.
- 1 vial (0.5 mL) 200 ng/mL HA Reference Solution.
- 1 vial (0.5 mL) 500 ng/mL HA Reference Solution.
- 1 vial (0.5 mL) 800 ng/mL HA Reference Solution.
- 1 bottle (13 mL) HRP-conjugated HAP Solution (red solution).
- 1 bottle (13 mL) One-component Substrate Solution (contains 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide, stabilized).
- 1 bottle (15 mL) Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid).
- 1 bottle (30 mL) Wash Concentrate [33x Phosphate Buffered Saline (PBS)]; 30 mL reconstitutes to 1 liter of 0.01M PBS, pH 7.35 ± 0.1.
- 1 vial (0.5 mL) HA High Control (acceptable range printed on vial label)
- 1 vial (0.5 mL) HA Moderate Control (acceptable range printed on vial label)
- 1 vial (0.5 mL) HA Low Control (acceptable range printed on vial label)

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *In Vitro* Diagnostic Use

1. Patient serum or plasma samples to be evaluated with this test, like all human blood derivatives, should be handled as potentially infectious material.
2. Do not pipette by mouth.
3. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or kit reagents are handled.
4. Wear disposable gloves while handling kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
5. Certain components are labeled with the following:
Irritating to eyes (R 36). Avoid contact with skin (S 24). Avoid contact with eyes (S 25). In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice (S 26). If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label (S 46).

Warning 

SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum or ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) plasma are the preferred sample matrices. Blood should be collected by venipuncture. Serum or plasma should be separated from cells by centrifugation. If not tested immediately, the specimens should be stored at 2 - 8°C. If specimens are to be stored for more than 72 hours, they should be frozen at -20°C or below. Specimens containing visible particulate matter should be clarified by centrifugation before testing.

INSTRUCTIONS FOR USE

Materials Provided

Hyaluronic Acid Test Kit; see "Reagents" for a complete listing.

Materials Required but not Supplied

- Reagent grade water (approximately 1L) to prepare PBS wash solution
- Graduated cylinders
- Precision pipettes capable of delivering between 5 and 1000 microliters, with appropriate tips
- Miscellaneous glass or plastic ware appropriate for small volume handling
- Flask, bottle or graduated cylinder, 1 liter
- Wash bottles, preferably with the tip partially cut back to provide a wide stream, or an automated or semi-automated plate washing system
- Multichannel pipettes capable of delivering to 8 wells simultaneously (strongly recommended)
- Microdilution tubes and a 96-well microdilution tube holder for sample dilutions
- Plate reading spectrophotometer capable of reading absorbance at 450 nm (with a 650 nm reference if available)
- Disposable gloves, powder-free recommended

Procedural Notes

1. Allow patient samples and kit reagents to warm to room temperature (20 - 26°C). Mix well before using; avoid foaming. Return all unused samples and reagents to refrigerated storage (2 - 8°C) as soon as possible.
2. All samples, including reference solutions and controls, should be assayed in duplicate wells.
3. Set up two wells as reagent blanks. Reaction buffer (without serum) is used for the reagent blank to serve as a 0 ng/mL HA reference solution.
4. The plate reader should be programmed to blank or zero against air.
5. Good washing technique is critical for optimal performance of the assay. Adequate washing is best accomplished by directing a forceful stream of wash solution from a plastic squeeze bottle with a wide tip into the bottom of the microwells. An automated microplate washing system may also be used.
6. IMPORTANT: Failure to adequately remove residual wash solution can cause inconsistent color development of the substrate solution.
7. Use a multichannel pipette capable of delivering to 8 wells simultaneously when possible. This speeds the process and provides more uniform incubation and reaction times for all wells.
8. Carefully controlled timing of all steps is important. For all incubations, the start of the incubation period begins with the completion of sample or reagent addition.
9. Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
10. Incubation temperatures other than room temperature (20 - 26°C) may contribute to inaccurate results.
11. Avoid contaminating reagents when opening and removing aliquots from the primary vials.
12. Do not use Tween 20 or other detergents in this assay.
13. Do not use kit components beyond expiration date.
14. Do not use kit components from different kit lots.

Reagent Preparation

Wash Solution (PBS): Dilute 30 mL of 33x PBS Wash Concentrate to 1 liter with reagent grade water. The pH of the final solution should be 7.35 ± 0.1 . Store unused PBS solution at 2 - 8°C. Discard if the solution shows signs of microbial or other contamination.

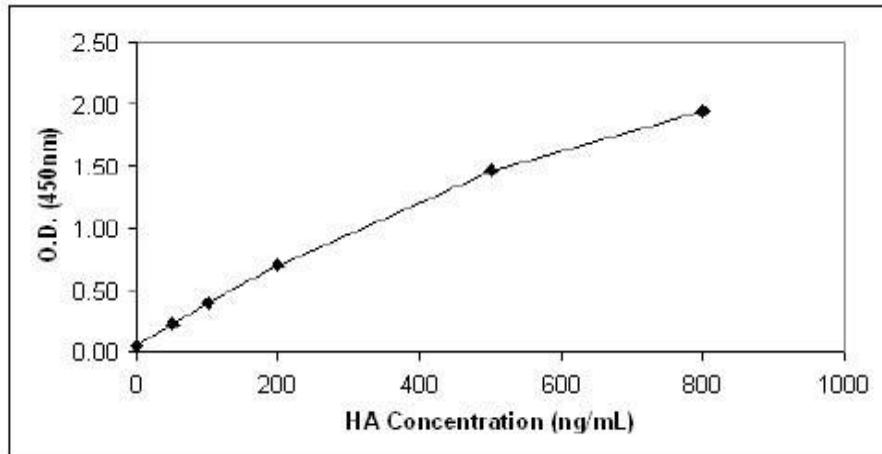
Assay Procedure

1. Assay HA reference solutions, HA controls, and reagent blank in duplicate. Duplicate determinations are also recommended for patient samples. Reaction Buffer without serum is used for the reagent blank, which represents the 0 ng/mL HA reference solution. The reagent blank will be treated the same as reference solutions, controls, or patient samples in subsequent assay steps.
2. Remove any microwell strips that will not be used in the run from the frame, and reseal in the foil pouch.
3. Prepare HA reference solutions, HA controls, and patient samples by adding 1 part of the solution or sample to 10 parts Reaction Buffer (blue solution). For example, 30 μ L of sample added to 300 μ L of Reaction Buffer will provide sufficient volume to test in duplicate.
4. Add 100 μ L of diluted HA reference solutions, HA controls, patient samples, and reaction buffer (for reagent blank) to appropriate microwells.
5. Incubate 60 minutes at room temperature (20 - 26°C).
6. After the incubation is complete, carefully invert microwells, and empty contents into a suitable container. Do not allow samples to contaminate other microwells. Wash wells 4 times with working wash solution (PBS), filling wells completely. Invert microwells between each wash to empty fluid. Use a snapping motion of the wrist to shake the liquid from the wells. Tap and/or blot plates on absorbent paper to remove residual wash buffer. Do not allow wells to dry out between steps.
7. Add 100 μ L HRP-conjugated HABP Solution (red solution) to all wells.
8. Incubate for 30 minutes at room temperature.
9. After the incubation is complete, carefully invert microwells and empty conjugate solution. Wash 4 times with PBS and tap or blot as described in Step 6. Do not allow the wells to dry out.
10. Add 100 μ L One-component Substrate Solution to each well and incubate for 30 minutes at room temperature. Add substrate solution to wells at a steady rate. Blue color will develop in wells with positive samples.
11. Add 100 μ L Stopping Solution (0.36 N sulfuric acid) to each well to stop the enzyme reaction. Be sure to add stopping solution to wells in the same order and at the same rate as the substrate solution.
12. Blank or zero the plate reader. Read the O.D. of each well at 450 nm (650 nm reference). Optical density (O.D) of wells should be measured within thirty minutes after the addition of stopping solution.

Results

1. Calculate the mean O.D. values for duplicate wells of HA reference solutions, HA controls, reagent blanks and patient samples.
2. Using third-order polynomial regression (recommended), 4-Parameter curve or hand plotting (point to point), calculate the best fit curve using the mean O.D.s of the 0 ng/mL (reagent blank), 50, 100, 200, 500, and 800 ng/mL reference solutions. A new curve must be plotted with each assay run. From this six point curve, calculate the resulting HA concentrations (ng/mL) in the HA controls and patient samples.

Example of reference curve
EXAMPLE ONLY, DO NOT USE



3. Samples with HA concentrations less than 20 ng/mL may be reported as “less than 20 ng/mL”. Samples with HA concentrations greater than 800 ng/mL may be reported as “greater than 800 ng/mL” or may be diluted up to 1:15 and reassayed to obtain more accurate results. Results from the second assay for these samples must be multiplied by the dilution factor to obtain the final HA concentration.
4. Assure that all quality control parameters have been met (see Quality Control) before reporting test results.

Quality Control

1. The mean O.D. value of the Reagent Blank should be ≤ 0.150 . Readings greater than 0.150 may indicate possible contamination of the One-component Substrate or other reagents.
2. The mean O.D. value of the 500 ng/mL HA reference solution should be 0.8 or greater.
3. Duplicate O.D.s should be within 20% of each other for samples with a mean O.D. reading of greater than 0.3.
4. The values obtained for the HA Controls should be within the ranges printed on each container label. Testing variables in each laboratory, including equipment and technique, may influence control recovery; each laboratory should consider establishing its own acceptable range for the HA Controls.
5. Each laboratory should periodically confirm the normal cut-off and prevalence values for their population of patients. See performance characteristics.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Expected values²⁴

HA levels were measured in 199 healthy adults across three HA kit lots using CLSI C28-A3c. The mean HA value of this population was determined to be 17.3 ng/mL with a standard deviation of 12.8 ng/mL. Using the non-parametric technique, the four highest and lowest values were eliminated. **The resulting normal range of ≤ 56 ng/mL** includes the remaining 95% of samples.

Data suggests further monitoring may be indicated in patients with HA levels between 56 – 150 ng/mL (see clinical performance data below). **The cut point for clinical decision making³⁰ is 150 ng/mL**, indicating the potential for advanced fibrosis. Liver biopsy may be indicated in individuals with advanced fibrosis³⁰.

Clinical Performance²⁴ Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)

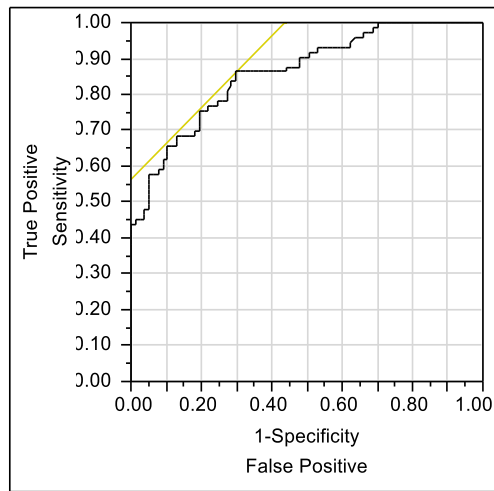
Serum samples from NASH patients were obtained from the National Institute of Health (NIH) – NIDDK division in two separate sets: training set, n = 340 and validation set, n = 300. The training study evaluated clinical performance of the HA assay against liver fibrosis and an appropriate cut point was established to detect advanced fibrosis in a NASH cohort. The data was then validated at the selected cut point. The percent positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were calculated using the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve method by comparing HA values (ng/mL) against the presence of advanced liver fibrosis (METAVIR F3-F4), assessed by histological examination of liver biopsy specimens. **The cut point for clinical decision making³⁰ is 150 ng/mL.** The HA assay displayed a PPV of 88.0% and NPV of 81.4% for identifying patients with advanced fibrosis at the cut point.

The table below outlines the test characteristics of the HA test kit at 150 ng/mL:

	Validation Set
Positive Predictive Value	88.0%
Negative Predictive Value	81.4%

The following figure shows the ROC (area under the curve) to assess advanced fibrosis (F3 and F4) in NASH patients:

Validation Set:



Area Under Curve = 0.86070

The area under the curve for the validation set is 0.86070, supporting clinical performance of the HA assay to assess advanced fibrosis in NASH patients.

Analytical Performance²⁴

Precision:

The precision was assessed as specified in CLSI EP5-A2 using high, moderate and low serum samples.

	Low	Moderate	High
Actual Value (ng/mL)	53.5	147.1	721.7
Repeatability Estimate (%CV)	13.5%	9.3%	8.1%
Estimate of Within-Lab Precision (%CV)	16.2%	13.0%	14.5%
Between Day Precision (%CV)	NC	5%	7%
Between Run, Within-Day (%CV)	11%	8%	10%

NC: Not calculable or <0

Reproducibility:

Reproducibility data was calculated according to CLSI EP5-A2 and ISO PDTR 22971 (Practical Guide to ISO 5725-2: 1994, TC 69/SC 6.)

The summary of data from all testing sites is summarized below:

	Low	Moderate	Low Positive	Moderate Positive
Actual Value (ng/mL)	32.3	122.0	372.4	613.1
Repeatability Estimate (%CV)	7.7%	5.9%	8.6%	6.9%
Repeatability Limit	7.0	20.2	90.1	117.8
Between Lab Estimate (%CV)	3.2%	3.2%	4.9%	3.6%
Reproducibility Estimate (%CV)	8.3%	5.0%	7.1%	5.8%
Reproducibility Limit	7.5	17.1	73.9	100.2

Linearity:

The linearity of the Hyaluronic Acid Test Kit was assessed as specified in CLSI EP6-A and has been demonstrated to be linear from 20 ng/mL to 1300 ng/mL within $\pm 10\%$ in this interval.

Limit of Blank (LoB) / Limit of Detection (LoD):

Based on 360 determinations (180 blank and 180 positive) using CLSI EP17-A, the LoD for the HA Test Kit is 11 ng/mL with a 95% probability of obtaining a positive response (a result that exceeds LoB) at this level and a 95% probability of obtaining a negative response on blank samples. A LoB of 7 ng/mL was used.

INTERFERENCE AND CROSS-REACTIVITY²⁴

The HA Test Kit was evaluated for interference according to CLSI EP7-A2. The following serum/plasma constituents were added to serum with low, moderate and high HA levels. No interference was found at the levels below:

Hemoglobin	200 mg/mL	20,000 mg/dL	N/A
Conjugated Bilirubin	0.5 mg/mL	50 mg/dL	855 mmol/L
Free Bilirubin	0.5 mg/mL	50 mg/dL	855 mmol/L
Triglycerides	50 mg/mL	5000 mg/dL	56.5 mmol/L

Cross-reactivity between HA and IgM Rheumatoid Factor was evaluated. IgM Rheumatoid Factor, when added to serum with low, moderate and high levels of HA according to NCCLS EP7-A2, was found to cross-react at <2% at all levels with IgM Rheumatoid Factor.

Cross-reactivity between HA and a mixture of glycosaminoglycan compounds (chondroitin-6-sulfate, chondroitin-4-sulfate, chondroitin-2,6-sulfate and chondroitin-4-6-sulfate) was evaluated. This mixture when added to serum with low, moderate and high HA levels according to NCCLS EP7-A2, was found to cross-react at <2% at all levels with glycosaminoglycan compounds.

LIMITATIONS OF THE TEST

The Hyaluronic Acid levels obtained with this assay can be used to assess advanced fibrosis in patients with chronic liver disease. Each physician must interpret these results in light of the patient's history, physical findings, and other diagnostic procedures.

Serum HA levels can be elevated during synovial inflammation and cartilage destruction as seen in rheumatoid arthritis (RA), due to increased production and passage into circulation. Elevated serum levels of HA have also been reported in some patients with more advanced or active osteoarthritis (OA), progressive systemic sclerosis (PSS) and systemic lupus erythematosus (SLE), and are believed to result from growth factor activity in connective tissue cells and synovial involvement.²⁶⁻²⁸

As reported in the literature,²⁶ studies show that age has an increased effect on HA levels in healthy individuals although the effect was minimal. The rate of increase was shown to be approximately 0.36 ng/mL per year in healthy individuals.

Warranty

This product is warranted to perform as described in this package insert. Corgenix, Inc. disclaims any implied warranty of merchantability or fitness for a particular use, and in no event shall Corgenix, Inc. be liable for consequential damage.

For Technical or Customer Service in the United States, phone 1-800-729-5661. Outside the United States phone 303-457-4345, fax 303-457-4519, email: technicalsupport@corgenix.com or contact a Corgenix authorized distributor.

TESTKIT ZUR BESTIMMUNG VON HYALURONSÄURE (HS)***In-vitro*-Diagnostikum****ANWENDUNGSGEBIET**

Test mit Enzym-verknüpften Bindungsproteinen zur Bestimmung von Hyaluronsäure (HS) in Humanserum oder Humanplasma. HS wird als serologischer Marker für Leberfibrose genutzt, der zusammen mit anderen histologischen, klinischen und serologischen Parametern verwendet wird, um bei Patienten mit chronischer Lebererkrankung aufgrund nichtalkoholischer Steatohepatitis (NASH) fortgeschrittene Fibrose (Metavir F3-4) zu prognostizieren.

ZUSAMMENFASSENDER ERLÄUTERUNG

Hyaluronsäure (HS), auch unter der Bezeichnung Hyaluronat oder Hyaluronan bekannt, ist ein Glykosaminoglykan, d. h. ein hochmolekulares Polysaccharid mit unverzweigtem Grundgerüst, das aus alternierenden Einheiten von β -(1-4)-Glukuronsäure und β -(1-3)-N-Azetylglukosamin besteht. Jedes Dimer wird als eine Einheit angesehen und hat ein Molekulargewicht von ca. 450 Da. Die Länge des HS-Moleküls kann zwischen weniger als 10 und mehr als 1000 Einheiten variieren.¹⁻⁴ HS wird hauptsächlich in Fibroblasten und anderen spezialisierten Bindegewebszellen produziert. Sie spielt eine Rolle als Strukturbaustein der Bindegewebsmatrix (Proteoglykan) sowie bei verschiedenen Interaktionen zwischen Zellen. HS ist im ganzen Körper vorhanden und liegt als freies Molekül im Plasma und in der Synovialflüssigkeit vor. Im Plasma wird die Halbwertszeit des HS-Moleküls auf etwa 5 bis 6 Minuten geschätzt.^{3,4} HS wird in hoher Konzentration in der Synovialflüssigkeit gefunden, wo sie für die normale Wasserretention verantwortlich ist und als Gelenkschmiere wirkt. Die synoviale HS kann über das Lymphsystem ins Plasma gelangen.⁵ Im Kreislauf werden die HS-Spiegel durch einen wirkungsvollen rezeptorabhängigen Eliminierungsmechanismus in den sinusoidalen Endothelzellen der Leber (SEC) sowie durch die enzymatische Wirkung der Hyaluronidase reguliert.^{6,7}

Erhöhte HS-Serumspiegel wurden bei verschiedenen Lebererkrankungen mit Leberfibrose bzw. -zirrhose gefunden, wobei die höheren Serumspiegel entweder das Ergebnis einer geringeren HS-Eliminierungsrate in der Leber oder einer gesteigerten HS-Produktion in der Leber bei Leberentzündungen sind.^{8,9} Erhöhte HS-Spiegel korrelierten besser mit dem Auftreten histopathologischer Leberschäden als konventionelle Leberfunktionstests wie z. B. ALT/AST, alkalische Phosphatase und Bilirubin.^{10,11} Es wurde vorgeschlagen, dass die Bestimmung der HS-Serumspiegel für die Unterscheidung zwischen zirrhotischer und nichtzirrhotischer Leber, zur Abschätzung des Schweregrades einer Leberfibrose sowie zur Überwachung der Leberfunktion nützlich sein könnte.¹²⁻¹⁶ Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass HS-Spiegel bei Patienten mit chronischer Hepatitis C das Ausmaß der Leberfibrose widerspiegeln und für die Überwachung des Erfolgs einer Interferon-alpha-Behandlung nützlich sein können.¹⁷⁻¹⁹ Eine ähnliche Korrelation wurde bei Patienten mit Alkoholzirrhose²⁰ und primärer biliärer Zirrhose beobachtet.¹⁰ Ferner hat es sich gezeigt, dass HS-Spiegel frühzeitig auf Leberschädendurch toxische Wirkstoffe wie z. B. Äthanol, Azetaminophen und bakterielle Lipopolysaccharide hinweisen, da pathologische Veränderungen an den SEC als Reaktion auf diese Wirkstoffe den pathologischen Veränderungen an den Hepatozyten vorausgehen.^{13,21}

NASH ist ein Typ der nichtalkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD), deren Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung auf 3 - 5 % geschätzt wird. Sie ist charakterisiert durch das Vorliegen von Lebersteatose und Leberentzündung sowie Schädigung der Hepatozyten (Ballooning) mit oder ohne Fibrose.³⁰ Klinische Daten zeigen, dass bei NASH-Patienten mit Leberfibrose die HS-Spiegel erhöht sind.²⁴

TESTPRINZIP

Bei dem HS-Testkit handelt es sich um einen Assay mit Enzym-verknüpften Bindungsproteinen zur Bestimmung des HS-Spiegels, wobei als Bindungsmolekül das sogenannte Hyaluronsäure-bindende Protein (HABP) eingesetzt wird.^{22, 23, 25} HABP fungiert als spezifischer Rezeptor für HS und verknüpft sie *in vivo* mit dem Core-Protein und anderen Glykosaminoglykanen zu Proteoglykan-Komplexen. Für diesen Assay werden Mikrovertiefungen mit natürlichem, durch Affinitätsreinigung aus dem Nasenknorpel von Rindern isoliertem HABP beschichtet und zur spezifischen Bindung von HS verwendet. Außerdem wird eine Enzym-konjugierte Form von HABP verwendet, um die in den HABP-beschichteten Mikrovertiefungen aus humanem Serum oder Plasma abgefangene HS zu bestimmen.^{28,29} HABP wird am Boden und an den Seiten der Vertiefungen von Mikrotiterplatten gebunden, blockiert und stabilisiert. In den Vertiefungen werden verdünnte Serum- oder Plasmaproben von Patienten inkubiert, so dass alle verfügbare HS an das immobilisierte HABP binden kann. Anschließend werden die Platten gewaschen, um ungebundene Moleküle aus dem Serum oder Plasma zu entfernen.

Die gebundene HS wird mithilfe eines zweiten HABP-Moleküls quantifiziert, das mit einem Enzym (Meerrettichperoxidase) konjugiert ist. Ungebundenes konjugiertes HABP wird anschließend durch Waschen entfernt. Gebundenes konjugiertes HABP wird mit einem Substrat-Chromophor-System inkubiert. Am Ende der Inkubation wird die entstandene Färbung spektrophotometrisch in Einheiten der optischen Dichte (OD-Einheiten) gemessen. Die HS-Konzentration im Serum oder Plasma von Patienten wird anhand einer Standardkurve mit den OD-Werten von fünf HS-Standardproben mit bekannter HS-Konzentration und einer Leerprobe (0 ng/ml) bestimmt.

REAGENZIEN

Bei 2 - 8 °C aufbewahren. Nicht einfrieren.

Ein HS-Testkit für insgesamt 96 Mikrovertiefungen enthält die folgenden Reagenzien (die Volumina sind je nach Kitgröße und -konfiguration unterschiedlich):

- 12 mit stabilisiertem HABP beschichtete Mikrotiterstreifen mit je 8 Vertiefungen und Halterung
- 1 Fläschchen (57 ml) Reaktionspuffer (blaue Lösung)
- 1 Fläschchen (0,5 ml) 50-ng/ml-Standard
- 1 Fläschchen (0,5 ml) 100-ng/ml-Standard
- 1 Fläschchen (0,5 ml) 200-ng/ml-Standard
- 1 Fläschchen (0,5 ml) 500-ng/ml-Standard
- 1 Fläschchen (0,5 ml) 800-ng/ml-Standard
- 1 Fläschchen (13 ml) mit einer Lösung von HRP-konjugiertem HABP (rote Lösung)
- 1 Fläschchen (13 ml) Einkomponentensubstratlösung (enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin und stabilisiertes Wasserstoffperoxid)
- 1 Flasche (15 ml) Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure)
- 1 Flasche (30 ml) Waschlösungskonzentrat [33x phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung (PBS)]; 30 ml ergeben nach Rekonstitution 1 Liter 0,01M PBS, pH 7,35 ± 0.1
- 1 Fläschchen (0,5 ml) HS-Kontrolle hoher Konzentration (der zulässige Bereich ist auf das Fläschchenetikett aufgedruckt)
- 1 Fläschchen (0,5 ml) HS-Kontrolle mittlerer Konzentration (der zulässige Bereich ist auf das Fläschchenetikett aufgedruckt)
- 1 Fläschchen (0,5 ml) HS-Kontrolle niedriger Konzentration (der zulässige Bereich ist auf das Fläschchenetikett aufgedruckt)

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

In-vitro-Diagnostikum

1. Wie alle humanen Blutderivate sollten auch die mit diesem Test zu evaluierenden Patientenserum- bzw. -plasmaproben wie potenziell infektiöses Material gehandhabt werden.
2. Nicht mit dem Mund pipettieren.
3. In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verarbeitet werden, nicht rauchen, essen und trinken.
4. Bei der Handhabung von Kit-Reagenzien Einmalhandschuhe tragen und danach gründlich die Hände waschen.
5. Einzelne Komponenten sind wie folgt klassifiziert:
Reizt die Augen (R 36). Berührung mit der Haut vermeiden (S 24). Berührung mit den Augen vermeiden (S 25). Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren (S 26). Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen (S 46).

Warnschuwung .

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Die bevorzugten Probenmatrizes sind Serum oder Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Plasma. Blut sollte durch Venenpunktion gewonnen werden. Serum oder Plasma sollte durch Zentrifugation von den Zellen abgetrennt werden. Wenn die Proben nicht sofort analysiert werden, sind sie bei 2 - 8 °C aufzubewahren. Sollen die Proben länger als 72 Stunden aufbewahrt werden, müssen sie bei -20 °C oder kälter eingefroren werden. Proben, die sichtbare Partikel enthalten, müssen vor dem Test zur Abtrennung der Partikel zentrifugiert werden.

GEBRAUCHSANWEISUNG

Packungsinhalt

Hyaluronsäure-Testkit; eine komplette Auflistung ist unter „Reagenzien“ zu finden.

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

- Wasser von Reagenzqualität zur Herstellung der PBS-Waschlösung (ca. 1 l)
- Messzylinder
- Präzisionspipetten mit passenden Pipettenspitzen zum Pipettieren von 5 bis 1000 Mikrolitern
- Diverse Glas- oder Plastikgeräte zur Handhabung kleiner Volumina
- Kolben, Flasche oder Messzylinder, 1 l
- Waschflaschen, vorzugsweise mit teilweise abgeschnittener Spitze, um einen breiten Strahl zu erzielen, oder ein automatisches oder halbautomatisches Plattenwaschsystem
- Mehrkanalpipetten, mit denen 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können (dringend empfohlen)
- Mikrodilutionsröhrchen und ein Mikrodilutionsröhrchenständer mit 96 Vertiefungen für Probenverdünnungen
- Spektralphotometer zur Auswertung von Mikrotiterplatten durch Messung der Extinktion bei 450 nm (mit 650 nm als Referenzwellenlänge, sofern verfügbar)
- Einmalhandschuhe, vorzugsweise talkumfrei

Hinweise zum Verfahren

1. Patientenproben und Kitreagenzien auf Raumtemperatur (20 - 26 °C) aufwärmen lassen. Vor Gebrauch gründlich durchmischen; Schaumbildung vermeiden. Alle nicht gebrauchten Proben und Reagenzien so schnell wie möglich wieder in den Kühlschrank/Kühlraum (2 - 8 °C) zurückstellen.
2. Für alle Proben, einschließlich Standards, sollten Doppelbestimmungen durchgeführt werden.
3. Zwei Vertiefungen für Leerproben vorbereiten. Bei den Leerproben dient Reaktionspuffer (ohne Serum) als 0-ng/ml-Standard.
4. Das Plattenlesegerät ist so zu programmieren, dass es gegen Luft Null anzeigt.
5. Voraussetzung für eine optimale Durchführung des Assays ist eine wirksame Waschmethode. Ausreichendes Waschen lässt sich am besten dadurch erreichen, dass ein kräftiger Waschlösungsstrahl aus einer Plastikspritzflasche mit einer weiten Spritzöffnung auf den Boden der Mikrovertiefungen gerichtet wird. Es kann auch ein automatisches Plattenwaschsystem verwendet werden.
6. WICHTIG: Wenn restliche Waschlösung nicht ausreichend entfernt wird, kann eine gleichförmige Farbentwicklung in der Substratlösung nicht gewährleistet werden.
7. Wenn möglich, sollte eine Mehrkanalpipette benutzt werden, mit der 8 Vertiefungen gleichzeitig beschickt werden können. Dies beschleunigt die Durchführung des Tests und gewährleistet gleichförmigere Inkubations- und Reaktionszeiten in den Vertiefungen.
8. Es ist wichtig, dass das Zeitprotokoll für alle Schritte sorgfältig eingehalten wird. Die Inkubationsperiode beginnt immer unmittelbar nach Zugabe der Probe bzw. des Reagenz.
9. Die Zugabe aller Proben und Reagenzien sollte immer mit der gleichen Geschwindigkeit und in gleicher Reihenfolge erfolgen.
10. Wenn die Inkubationstemperatur nicht der Raumtemperatur (20 - 26 °C) entspricht, kann dies zu ungenauen Ergebnissen beitragen.
11. Immer darauf achten, dass beim Öffnen der Primärfläschchen bzw. beim Abnehmen von Aliquots die Reagenzien nicht verunreinigt werden.
12. Kein Tween 20 oder andere oberflächenaktive Stoffe bei diesem Test verwenden.
13. Die Komponenten des Kits dürfen nach dem Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
14. Kitkomponenten von verschiedenen Kitchargen dürfen nicht miteinander kombiniert werden.

Vorbereitung der Reagenzien

Waschlösung (PBS): 30 ml 33x PBS-Waschkonzentrat mit Wasser von Reagenzqualität auf 1 Liter auffüllen. Der pH-Wert der endgültigen Lösung sollte bei $7,35 \pm 0,1$ liegen. Nicht aufgebrauchte PBS-Lösung ist bei 2 - 8 °C aufzubewahren. Bei ersten Anzeichen einer mikrobiellen oder sonstigen Kontamination ist die Lösung zu verwerfen.

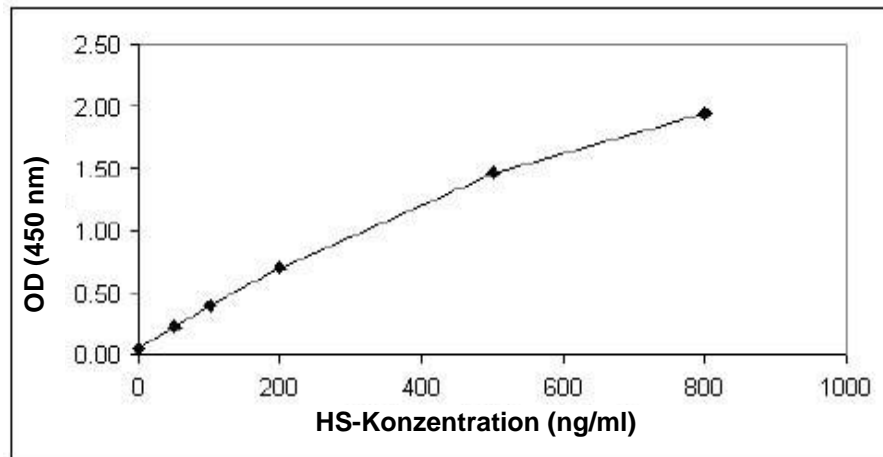
Durchführung des Tests

1. Die Analyse der HS-Standards, der HS-Kontrollen sowie der Leerproben sollte jeweils doppelt durchgeführt werden. Für die Patientenproben werden ebenfalls Doppelbestimmungen empfohlen. Als Leerprobe wird Reaktionspuffer ohne Serum verwendet, der einer Standardlösung mit 0 ng/ml HS entspricht. Bei den nachfolgenden Testschritten wird die Leerprobe genau so behandelt wie die Standards, Kontrollen und die Patientenproben.
2. Mikrotiterstreifen, die für den geplanten Test nicht gebraucht werden, aus der Halterung nehmen und wieder im dicht verschlossenen Folienbeutel aufbewahren.
3. Für den Test wird jeweils ein Teil Standard, HS-Kontrolle bzw. Patientenprobe mit 10 Teilen Reaktionspuffer (blaue Lösung) verdünnt. So erhält man z. B. durch Verdünnen von 30 µl Probe mit 300 µl Reaktionspuffer ein genügend großes Volumen, um den Test doppelt durchführen zu können.
4. Die Mikrovertiefungen werden jeweils mit 100 µl verdünnter Standardlösung, HS-Kontrolle, Patientenprobe oder (als Leerprobe) mit Reaktionspuffer gefüllt.
5. 60 Minuten bei Raumtemperatur (20 - 26 °C) inkubieren.
6. Nach der Inkubation wird der Inhalt der Mikrovertiefungen durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrotiterplatte in einen geeigneten Behälter entleert. Dabei ist darauf zu achten, dass durch die Proben keine anderen Mikrowells kontaminiert werden. Die Mikrovertiefungen werden viermal mit PBS-Arbeitswaschlösung gewaschen, wobei die Mikrovertiefungen jeweils vollständig gefüllt werden. Die Mikrovertiefungen nach jedem Waschvorgang umdrehen, um sie zu entleeren. Dabei wird die Flüssigkeit durch eine schleudernde Bewegung des Handgelenks aus den Vertiefungen geschüttelt. Restlicher Waschpuffer wird durch leichtes Aufdrücken/Aufklopfen der Platten auf saugfähiges Papier entfernt. Die Vertiefungen dürfen zwischen den einzelnen Waschschrritten nicht austrocknen.
7. 100 µl Lösung mit HRP-konjugiertem HAPB (rote Lösung) in alle Vertiefungen geben.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Nach der Inkubation wird die Konjugatlösung durch vorsichtiges Umdrehen der Mikrovertiefungen entleert. Viermal wie in Schritt 6 beschrieben mit PBS waschen und Flüssigkeit durch Aufdrücken/Aufklopfen entfernen. Dabei die Vertiefungen nicht austrocknen lassen.
10. Jede Vertiefung mit 100 µl Einkomponentensubstratlösung füllen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Die Substratlösung muss den Vertiefungen mit einem gleichmäßigen Tempo zugesetzt werden. Bei positiver Reaktion färbt sich der Inhalt der Vertiefungen blau.
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von 100 µl Stopplösung (0,36 N Schwefelsäure) pro Vertiefung beendet. Dabei ist darauf zu achten, dass die Stopplösung in derselben Reihenfolge und mit demselben Tempo zugegeben wird wie die Substratlösung.
12. Den Nullpunkt des Mikrotiterplattenlesegeräts einstellen. Die optische Dichte (OD) der in den einzelnen Vertiefungen enthaltenen Flüssigkeit wird bei 450 nm bestimmt (Referenz 650 nm). Die OD muss innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stopplösung gemessen werden.

Ergebnisse

1. Für alle Doppelbestimmungen der Standards, Kontrollen, Leerproben und Patientenproben wird der Mittelwert der OD berechnet.
2. Unter Verwendung der OD-Mittelwerte der 0- (Leerprobe), 50-, 100-, 200-, 500- und 800-ng/ml-Standards wird mittels polynominaler Regression dritten Grades (empfohlen), anhand einer 4-Parameter-Funktion oder durch Auftragung von Hand (von Punkt zu Punkt) die Ausgleichskurve erstellt. Für jeden Testlauf muss eine neue Kurve erstellt werden. Anhand dieser 6-Punkte-Kurve wird die in den HS-Kontrollen und den Patientenproben jeweils vorhandene HS-Konzentration bestimmt (in ng/ml).

Beispiel für eine Eichkurve
NUR ZUR ILLUSTRATION, NICHT FÜR TATSÄCHLICH DURCHGEFÜHRTE TESTS VERWENDEN



3. Für Proben mit einer HS-Konzentration von weniger als 20 ng/ml wird im Bericht „weniger als 20 ng/ml“ angegeben. Für Proben mit HS-Konzentrationen über 800 ng/ml kann im Bericht entweder „> 800 ng/ml“ vermerkt werden oder sie können weiter verdünnt und erneut analysiert werden, um genauere Ergebnisse zu erhalten. Bei solchen Proben muss das Ergebnis der zweiten Analyse mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die endgültige HS-Konzentration zu erhalten.
4. Bevor ein Bericht über die Analyseergebnisse erstellt wird, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Qualitätskontrolle).

Qualitätskontrolle

1. Die mittlere optische Dichte der Leerprobe sollte $\leq 0,150$ sein. Ein höherer Messwert als 0,150 kann ein Hinweis auf eine Kontamination der Einkomponentensubstratlösung oder anderer Reagenzien sein.
2. Die mittlere optische Dichte des 500-ng/ml-Standard sollte mindestens 0,8 betragen.
3. Bei Doppelbestimmungen sollten für Proben mit einer optischen Dichte von über 0,3 die beiden Messwerte nicht mehr als 20 % voneinander abweichen.
4. Die für die HS-Kontrollen erhaltenen Werte sollten innerhalb der Bereiche liegen, die auf den Behältnisetiketten aufgedruckt sind. Testvariablen in einzelnen Labors, wie z. B. Ausrüstung und Methode, können die Wiederfindung im Fall der Kontrollen beeinflussen; daher sollte jedes Labor seine eigenen zulässigen Bereiche für die HS-Kontrollen festlegen.
5. Jedes Labor sollte in regelmäßigen Abständen die Grenzwerte des Normalbereichs und Prävalenzwerte für seine Patientenpopulation bestimmen. Siehe Leistungsmerkmale.

LEISTUNGSMERKMALE

Erwartete Werte²⁴

Die HS-Spiegel von 199 gesunden Probanden wurden gemäß der CLSI-Richtlinie C28-A3c mit drei Kitchargen bestimmt. Als HS-Mittelwert für diese Population wurde 17,3 ng/ml mit einer Standardabweichung von 12,8 ng/ml erhalten. Mithilfe des nichtparametrischen Auswertungsverfahrens wurden die vier höchsten und niedrigsten Werte eliminiert. **Der erhaltene Normalbereich von ≤ 56 ng/ml** umfasste die übrigen 95 % der Proben.

Die Daten weisen darauf hin, dass bei Patienten mit HS-Spiegeln von 56 - 150 ng/ml (siehe klinische Leistungsmerkmale im nächsten Abschnitt) eine weitere Überwachung angezeigt ist. **Der Cutoff-Wert für die klinische Entscheidungsfindung,³⁰ der die Möglichkeit einer fortgeschrittenen Fibrose anzeigt, liegt bei 150 ng/ml.** Bei Patienten mit fortgeschrittener Fibrose ist u. U. eine Leberbiopsie angezeigt.³⁰

Klinische Leistungsmerkmale²⁴

Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)

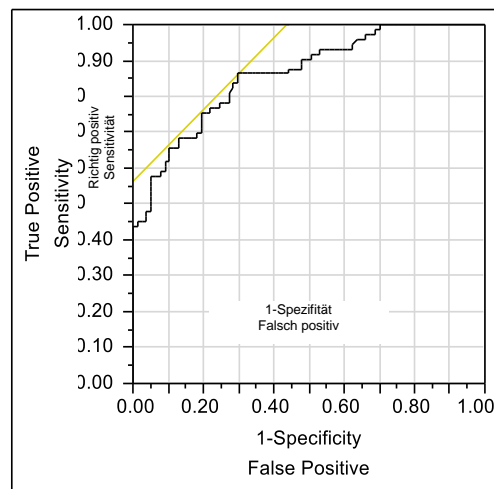
Von der Abteilung NIDDK des National Institute of Health (NIH) der USA wurden zwei separate Sätze von Serumproben von NASH-Patienten bezogen: ein Satz mit 340 Proben zur Etablierung und ein Satz mit 300 Proben zur Validierung des Assays. Bei der Studie zur Etablierung des Assays wurden die klinischen Leistungsmerkmale des HS-Assays bei Leberfibrose beurteilt und ein geeigneter Cutoff-Wert zum Nachweis einer fortgeschrittenen Fibrose bei einer Kohorte von NASH-Patienten festgelegt. Daraufhin wurden die Daten am festgelegten Cutoff-Wert validiert. Der prozentuale positive (PPV) bzw. negative prädiktive Wert (NPV) wurde mittels Receiver Operating Characteristic-(ROC-)Kurvenanalyse bestimmt anhand des Vergleichs von HS-Werten (ng/ml) mit dem Vorliegen von fortgeschrittener Fibrose (METAVIR F3-F4), das anhand von Leberbiopsien nachgewiesen wurde. **Der Cutoff-Wert für die klinische Entscheidungsfindung³⁰ liegt bei 150 ng/ml.** Der HS-Assay ergab einen PPV von 88,0 % und einen NPV von 81,4 % bei der Identifizierung von Patienten mit fortgeschrittener Fibrose am Cutoff-Wert.

In der nachstehenden Tabelle sind die Leistungsmerkmale des HS-Testkits bei 150 ng/ml zusammengefasst:

	Validierungssatz
Positiver prädiktiver Wert	88,0 %
Negativer prädiktiver Wert	81,4 %

Die folgende Abbildung zeigt die ROC-Kurve (Fläche unter der Kurve) für die Beurteilung von Serumproben von NASH-Patienten im Hinblick auf fortgeschrittene Leberfibrose (F3 und F4):

Validierungssatz:



Fläche unter der Kurve = 0,86070

Die Fläche unter der Kurve für den Validierungssatz beträgt 0,86070, was für die klinische Leistungsfähigkeit des HS-Assays bei der Beurteilung von NASH-Patienten im Hinblick auf fortgeschrittene Fibrose spricht.

Analytische Leistungsmerkmale²⁴

Präzision:

Die Präzision wurde unter Verwendung von Proben mit hoher, mittlerer und niedriger Konzentration beurteilt wie in der CLSI-Richtlinie EP5-A2 beschrieben.

	Niedrig	Mittel	Hoch
Tatsächlicher Wert (ng/ml)	53,5	147,1	721,7
Wiederholgenauigkeit (% VK)	13,5 %	9,3 %	8,1 %
Intra-Labor-Präzision (% VK)	16,2 %	13,0 %	14,5 %
Inter-Tag-Präzision (% VK)	n. b.	5 %	7 %
Inter-Assay-Präzision (% VK)	11 %	8 %	10 %

n. b.: nicht berechenbar oder < 0

Reproduzierbarkeit:

Die Reproduzierbarkeit wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien CLSI EP5-A2 und ISO PDTR 22971 (Practical Guide to ISO 5725-2: 1994, TC 69/SC 6) beurteilt.

Die Zusammenfassung der Daten aller Teststandorte ist nachstehend zusammengefasst:

	Niedrig	Mittel	Niedrig positiv	Mäßig positiv
Tatsächlicher Wert (ng/ml)	32,3	122,0	372,4	613,1
Wiederholgenauigkeit (% VK)	7,7 %	5,9 %	8,6 %	6,9 %
Wiederholgrenze	7,0	20,2	90,1	117,8
Inter-Labor-Präzision (% VK)	3,2 %	3,2 %	4,9 %	3,6 %
Reproduzierbarkeit (% VK)	8,3 %	5,0 %	7,1 %	5,8 %
Reproduzierbarkeitsgrenze	7,5	17,1	73,9	100,2

Linearität:

Die Linearität des Hyaluronsäure-Testkits wurde beurteilt wie in der CLSI-Richtlinie EP6-A angegeben, und es wurde Linearität von 20 ng/ml bis 1300 ng/ml festgestellt, wobei die Abweichungen innerhalb dieses Bereichs $\pm 10\%$ betragen.

Leerwert-Obergrenze (LOB)/Nachweisgrenze (LOD):

Die anhand von 360 Bestimmungen (180 Leerproben und 180 positive Proben) gemäß CLSI-Richtlinie EP17-A ermittelte Nachweisgrenze des HS-Testkits liegt bei 11 ng/ml, bei einer 95%igen Wahrscheinlichkeit, für diese Konzentration ein positives Ergebnis zu erhalten (ein Ergebnis, das höher ist als die LOB), sowie einer 95%igen Wahrscheinlichkeit, für eine Leerprobe ein negatives Ergebnis zu erhalten. Es wurde mit einer LOB von 7 ng/ml gearbeitet.

INTERFERENZEN UND KREUZREAKTIVITÄT²⁴

Der HS-Testkit wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP7-A2 im Hinblick auf Interferenzen beurteilt. Die folgenden Serum- bzw. Plasmapbestandteile bei Zusatz zu Serum mit niedriger, mittlerer oder hoher HS-Konzentration. Bei den nachfolgend aufgeführten Konzentrationen wurde keine Interferenz gefunden:

Hämoglobin	200 mg/ml	20.000 mg/dl	n. z.
Konjugiertes Bilirubin	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/l
Freies Bilirubin	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/l
Triglyzeride	50 mg/ml	5000 mg/dl	56,5 mmol/l

Kreuzreaktivität zwischen HS und IgM-Rheumafaktor wurde untersucht. Bei Zugabe zu Serum mit niedrigem, mittlerem und hohem HS-Spiegel gemäß CLSI-Richtlinie EP7-A2 kreuzreagierte IgM-Rheumafaktor bei $< 2\%$ bei allen HS-Spiegeln mit IgM-Rheumafaktor.

Die Kreuzreaktivität zwischen HS und einer Mischung von Glykosaminoglykan-Verbindungen (Chondroitin-6-Sulfat, Chondroitin-4-Sulfat, Chondroitin-2,6-Sulfat und Chondroitin-4-6-Sulfat) wurde ebenfalls untersucht. Bei Zugabe zu Serum mit niedrigem, mittlerem und hohem HS-Spiegel gemäß CLSI-Richtlinie EP7-A2 kreuzreagierte diese Mischung bei $< 2\%$ bei allen HS-Spiegeln mit Glykosaminoglykan-Verbindungen.

GRENZEN DES TESTS

Die mit diesem Test ermittelten Hyaluronsäurespiegel können zur Beurteilung von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen im Hinblick auf das Vorliegen einer fortgeschrittenen Fibrose herangezogen werden. Jeder Arzt muss diese Ergebnisse im Zusammenhang mit der Krankengeschichte des Patienten, der körperlichen Untersuchung sowie den Ergebnissen anderer diagnostischer Verfahren interpretieren.

Bei synovialen Entzündungen, wie sie bei rheumatoider Arthritis (RA) und Knorpelzerstörung beobachtet werden, können die HS-Serumspiegel auf Grund gesteigerter Produktion und Freisetzung ins zirkulierende Blut ansteigen. Erhöhte HS-Serumspiegel wurden auch bei einigen Patienten mit weiter fortgeschrittener bzw. aktiver Osteoarthritis (OA), progressiver systemischer Sklerose (PSS) sowie systemischem Lupus erythematoses (SLE) beobachtet; es wird angenommen, dass sie auf die Wachstumsfaktoraktivität in den Bindegewebszellen sowie die Synovialbeteiligung zurückzuführen sind.²⁶⁻²⁸

In der Literatur²⁶ publizierte Studien haben gezeigt, dass das Alter bei gesunden Personen einen größeren Einfluss auf die HS-Spiegel hat, wobei der Effekt allerdings minimal war. Die Rate des Anstiegs betrug bei gesunden Personen ca. 0,36 ng/ml pro Jahr.

Garantie

Dieses Produkt wird mit der Garantie geliefert, dass es wie in dieser Packungsbeilage beschrieben funktioniert. Corgenix, Inc. macht keine stillschweigenden Zusicherungen hinsichtlich der allgemeinen Gebrauchstauglichkeit oder der Eignung für einen bestimmten Zweck und haftet in keinem Fall für Folgeschäden.

Unseren technischen oder allgemeinen Kundendienst erreichen Sie in den Vereinigten Staaten unter 1-800-729-5661. Außerhalb der USA wählen Sie bitte 303-457-4345 (Tel.), 303-457-4519 (Fax), schicken Sie eine E-Mail an: technicalsupport@corgenix.com oder wenden Sie sich an einen von Corgenix autorisierten Händler.

KIT DE TEST POUR L'ACIDE HYALURONIQUE (AH)

Pour usage diagnostique *in vitro*

UTILISATION PRÉVUE

Dosage immunoenzymatique de protéine liante pour la détermination de l'acide hyaluronique (AH) dans le sérum ou le plasma humains. Le AH est destiné à être utilisé en tant que marqueur sérologique de la fibrose hépatique afin d'être utilisé conjointement à d'autres informations histologiques, cliniques et sérologiques pour prédire la fibrose avancée (Metavir F3-4) chez des patient atteints d'une maladie hépatique chronique associée à une stéatose hépatique non alcoolique (NASH).

RÉSUMÉ ET PRINCIPE DU DOSAGE

L'acide hyaluronique (AH), aussi connu sous le nom d'hyaluronate ou hyaluronane, est un glycosaminoglycane – un polysaccharide à la masse moléculaire élevée avec un squelette non ramifié composé de séquences alternatives de fragments β -(1-4)-acide glucuronique et β -(1-3)-N-acétylglucosamine. Chaque dimère constitue une unité dont le poids moléculaire est d'environ 450 D. La longueur de la molécule de AH peut varier de 10 à plus de 1000 unités.¹⁻⁴ Le AH est principalement produit par les fibroblastes et d'autres cellules spécialisées de tissu conjonctif. Il joue un rôle structurel dans la matrice du tissu conjonctif (protéoglycane) ainsi que dans diverses interactions de cellule à cellule. Le AH est largement distribué dans le corps et peut être trouvé sous la forme d'une molécule libre dans le plasma et le fluide synovial. Dans le plasma, la demi-vie de la molécule de AH a été estimée à environ 5-6 minutes.^{3,4} Le AH est présent dans le fluide synovial en fortes concentrations et est responsable de la rétention d'eau normale et la lubrification de l'articulation. Le AH synovial peut passer dans le plasma via le système lymphatique.⁵ Dans la circulation, les niveaux de AH sont maintenus par un mécanisme d'enlèvement efficace de récepteur-dépendant présent dans les cellules sinusoidales endothéliales (SEC) du foie et par une action enzymatique d'hyaluronidase.^{6,7}

Les niveaux sériques de AH peuvent être augmentés dans diverses maladies du foie caractérisées par une fibrose et une cirrhose, en raison d'une avulsion hépatique diminuée et/ou d'une production hépatique augmentée de AH durant une inflammation du foie.^{8,9} Les niveaux accrus de AH ont montré une meilleure corrélation avec le degré de dommage histopathologique du foie en comparaison avec les tests conventionnels de la fonction du foie comprenant l'ALT/AST, la phosphatase alcaline et la bilirubine.^{10,11} Il a été proposé que la détermination des niveaux sériques de AH puissent être utiles pour distinguer un foie cirrhotique d'un foie non-cirrhotique, pour évaluer le degré d'une fibrose du foie et pour contrôler la fonction du foie.¹²⁻¹⁶ Il a également été montré que les niveaux de AH reflètent le degré de fibrose hépatique chez les patients atteints d'hépatite C et qu'ils peuvent être utiles pour contrôler la réponse à un traitement interféron alpha.¹⁷⁻¹⁹ Une corrélation similaire a été trouvée chez les patients atteints d'une cirrhose alcoolique²⁰ et d'une cirrhose biliaire primaire.¹⁰ Il a également été montré que les niveaux de AH sont un signe avant-coureur d'un dommage au foie causé par des agents toxiques comme l'éthanol, l'acétaminophène et le lipopolysaccharide bactérien, étant donné que des changements pathologiques des SEC en réponse à ces agents précèdent les changements pathologiques des hépatocytes.^{13,21}

La NASH est un type de maladie du foie gras non alcoolique (NAFLD) dont la prévalence s'élève à environ 3 à 5 % de la population générale. On la définit comme étant la présence d'une stéatose hépatique et d'une inflammation associée à une lésion hépatocytaire (ballonnement), associée ou non à une fibrose.³⁰ Les données cliniques suggèrent que des niveaux de AH élevés sont observés chez les patients atteints d'une NASH associée à une fibrose hépatique.²⁴

PRINCIPE DU TEST

Le kit de test AH mesure les niveaux de AH et est pratiqué en tant que dosage immunoenzymatique de protéine liante faisant appel à une molécule de capture dénommée protéine liante de l'acide hyaluronique (HABP).^{22, 23, 25} La HABP fonctionne comme un récepteur spécifique du AH et lie *in vivo* le AH à la protéine du noyau et à d'autres glycosaminoglycane pour former des complexes d'agrégats de protéoglycane. Dans cet essai, la HABP naturellement produite est isolée par purification d'affinité à partir de cartilage nasal bovin et enduite sur des micropuits afin de capturer le AH de façon spécifique. Une version de la HABP conjuguée à une enzyme est également utilisée pour mesurer le AH capturé à partir du sérum ou plasma humain par les micropuits enduits de HABP.²⁸⁻²⁹ La HABP est liée, bloquée et stabilisée au fond et sur les côtés des puits d'une plaque de microtitration.

Des échantillons de sérum ou de plasma dilués du patient sont incubés dans les puits, permettant au AH disponible de se lier à la HABP immobilisée. Les plaques sont alors rincées afin d'éliminer le sérum ou les molécules de plasma non-liés. Le AH lié est quantifié à l'aide d'une deuxième molécule de HABP conjuguée à une enzyme (peroxydase de raifort). La HABP conjuguée non liée est alors rincée. La HABP conjuguée liée est incubée avec un système de substrat/chromophore. Le développement final de la couleur est mesuré par spectrophotométrie en unités de densité optique (DO). Les concentrations de AH du sérum ou plasma du patient sont déterminées à partir d'une courbe de référence qui est le résultat des unités de DO de cinq échantillons de référence de AH dont la concentration de AH est connue et de 0 ng/ml (réactif à blanc).

RÉACTIFS

Stocker entre 2 et 8 °C. Ne pas congeler.

Chaque Kit de test AH pour 96 micropuits contient les réactifs suivants (les volumes varient selon la taille et la configuration du kit) :

- 12 barrettes de micropuits pour 8 puits enduits de HABP stabilisé, avec cadre.
- 1 bouteille (57 ml) de tampon de réaction (solution bleue).
- 1 flacon (0,5 ml) de solution de référence à 50 ng/ml de AH.
- 1 flacon (0,5 ml) de solution de référence à 100 ng/ml de AH.
- 1 flacon (0,5 ml) de solution de référence à 200 ng/ml de AH.
- 1 flacon (0,5 ml) de solution de référence à 500 ng/ml de AH.
- 1 flacon (0,5 ml) de solution de référence à 800 ng/ml de AH.
- 1 bouteille (13 ml) de solution conjuguée HABP/PR (solution rouge).
- 1 bouteille (13 ml) de solution substrat à un composant (contient 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine et peroxyde d'hydrogène, stabilisée).
- 1 bouteille (15 ml) de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N).
- 1 bouteille (30 ml) de concentré de lavage [33 x solution saline tamponnée au phosphate (PBS)] ; 30 ml reconstituent 1 litre de 0,01m PBS, pH 7,35 ± 0,1.
- 1 fiole (0,5 ml) HA High Control (valeurs acceptables imprimées sur l'étiquette)
- 1 fiole (0,5 ml) HA Moderate Control (valeurs acceptables imprimées sur l'étiquette)
- 1 fiole (0,5 ml) HA Low Control (valeurs acceptables imprimées sur l'étiquette)

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

Pour usage diagnostique *in vitro*

1. Comme tous les dérivés du sang humain, les échantillons de sérum et de plasma des patients doivent être manipulés en tant que matières potentiellement infectieuses.
2. Ne pas aspirer à la bouche.
3. Ne pas fumer, boire ou manger dans les zones où des échantillons ou des réactifs du kit sont manipulés.
4. Mettre des gants à usage unique pour manipuler les réactifs du kit et se laver soigneusement les mains ensuite.
5. Certains composants sont étiquetés avec la mention suivante :
Irritant pour les yeux (R 36). Éviter le contact avec la peau (S 24). Éviter le contact avec les yeux (S 25). En cas de contact avec les yeux, rincez immédiatement et abondamment avec de l'eau et demandez conseil à votre médecin (S 26). En cas d'ingestion, consultez immédiatement un médecin et montrez lui cette boîte ou la notice (S 46).

Avertissement  .

PRÉLÈVEMENT ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Le sérum ou l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) plasma constituent les matrices d'échantillons privilégiées. Le sang doit être prélevé par ponction veineuse. Le sérum ou le plasma doivent être séparés des cellules par centrifugation. Si le test n'est pas effectué immédiatement, les échantillons doivent être conservés entre 2 et 8 °C. Si les échantillons doivent être stockés plus de 72 heures, ils doivent être congelés à -20 °C ou moins. Les échantillons contenant des matières particulaires visibles doivent être clarifiés par centrifugation avant le test.

MODE D'EMPLOI

Matériel fourni

Kit de test de l'acide hyaluronique ; voir « Réactifs, » pour la liste complète.

Matériel requis mais non fourni

- Eau pure pour analyse (environ 1 L) pour préparer la solution de lavage PBS
- Cylindres gradués
- Pipettes de précision capables de délivrer entre 5 et 1000 microlitres, avec embouts appropriés
- Articles en verre ou plastique convenant à la manipulation de petits volumes
- Flacon, bouteille ou cylindre gradué, 1 litre
- Pissettes, de préférence munies d'un goulot partiellement découpé pour autoriser un débit élargi, ou bien un système de lavage de plaques automatique ou semi-automatique
- Pipettes multicanaux capables de distribuer dans 8 puits simultanément (vivement recommandé)
- Tubes de microdilution et un support de tubes de microdilution pour 96 puits pour diluer les échantillons
- Spectrophotomètre de lecture de plaque capable de lire la densité optique à 450 nm (avec une référence à 650 nm si disponible)
- Gants à usage unique, de préférence non talqués

Remarques concernant la procédure

1. Laisser les échantillons patient et les réactifs du kit se réchauffer à la température ambiante (20 à 26 °C). Bien mélanger avant l'utilisation, éviter la formation de mousse. Remettre dès que possible tous les échantillons et réactifs inutilisés dans le réfrigérateur (2 à 8 °C).
2. Tous les échantillons, y compris les solutions de référence et les contrôles doivent être analysés dans des cupules doubles.
3. Préparer deux puits en tant que réactifs à blanc. Le tampon de réaction (sans sérum) est utilisé pour le réactif à blanc afin de servir de solution AH de référence à 0 ng/ml.
4. Le lecteur de plaque doit être mis « à vide » ou à zéro sur l'air.
5. Une bonne technique de lavage est primordiale pour une performance optimale du dosage. La meilleure technique pour obtenir un lavage satisfaisant est de diriger en force un débit de solution de lavage dans le fond des micropuits à l'aide d'une poire en plastique à gros goulot. On peut aussi utiliser un système automatique de lavage de microplaque.
6. IMPORTANT : L'élimination imparfaite des résidus de solution de lavage risque de causer un développement irrégulier de la couleur de la solution de substrat.
7. Utiliser si possible une pipette multicanaux capable de distribuer dans 8 puits simultanément. Cela accélère la procédure et permet de mieux uniformiser la durée d'incubation et de réaction de tous les puits.
8. Le minutage soigneusement contrôlé de toutes les étapes est important. Pour toute incubation, le début de la période d'incubation commence lorsque l'ajout de l'échantillon ou de réactif est terminé.
9. L'ajout de tous les échantillons et réactifs doit s'effectuer au même rythme et dans le même ordre.
10. Une température d'incubation différente de la température ambiante (20 à 26 °C) peut causer des résultats erronés.
11. Éviter de contaminer les réactifs lors de l'ouverture des flacons primaires et des prélèvements fractionnés.
12. Ne pas utiliser de Tween 20 ou d'autres détergents dans ce dosage.
13. Ne pas utiliser les composants du kit au-delà de leur date de péremption.
14. Ne pas utiliser de composants provenant de kits de lots différents.

Préparation des réactifs

Solution de lavage (PBS) : Diluer 30 ml de concentré de lavage PBS 33x dans de l'eau pure pour analyse afin d'obtenir 1 litre. Le pH de la solution finale doit être de $7,35 \pm 0,1$. Conserver la solution de PBS inutilisée entre 2 et 8 °C. Jeter si la solution montre des signes de contamination microbienne ou autre.

Procédure de dosage

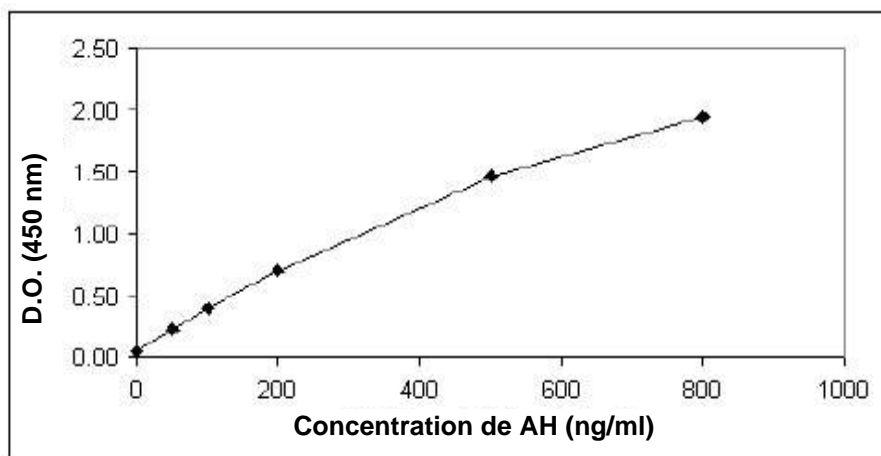
1. Solutions de référence d'analyse AH, contrôles AH et réactif à blanc en double. Des déterminations doubles sont également recommandées pour les échantillons de patients. Un tampon de réaction sans sérum est utilisé pour le réactif à blanc, ce qui représente la solution de référence de 0 ng/ml AH. Le réactif à blanc sera traité de la même manière que les solutions de référence, les contrôles et les échantillons de patient lors des étapes d'analyse suivantes.
2. Retirer toutes les barrettes de micropuits qui ne seront pas utilisés dans le lot de tests du cadre et les sceller dans la pochette métallisée.
3. Préparer les solutions de référence AH, les contrôles AH et les échantillons de patient en ajoutant 1 volume de la solution ou de l'échantillon pour 10 volumes de tampon de réaction (solution bleue). Par exemple, pour 30 µL d'échantillon, ajouter 300 µL de tampon de réaction pour obtenir un volume suffisant afin de réaliser un double test.
4. Ajouter 100 µL de solution de référence de AH diluée, les contrôles de AH, les échantillons de patient et le tampon de réaction (pour le réactif à blanc) aux microcupules appropriées.

5. Laisser incuber 60 minutes à température ambiante (entre 20 et 26 °C).
6. Lorsque l'incubation est terminée, retourner avec précaution les micropuits et en vider le contenu dans un conteneur approprié. Ne pas laisser les échantillons contaminer les autres micropuits. Laver les puits à 4 reprises en les remplissant complètement avec de la solution de lavage active (PBS). Retourner les microcupules entre chaque lavage pour vider le fluide. Secouer le liquide des puits d'un mouvement sec du poignet. Appuyer les plateaux sur du papier absorbant pour retirer tout résidu de lavage. Ne pas laisser sécher les puits entre les étapes.
7. Ajouter 100 µL de solution conjuguée HABP/PR (solution rouge) à tous les puits.
8. Laisser incuber 30 minutes à température ambiante.
9. Une fois l'incubation terminée, retourner soigneusement les micro cupules et vider la solution conjuguée. Laver 4 fois avec du PBS et appuyer ou essuyer comme décrit à l'étape 6. Ne pas laisser les cupules sécher.
10. Ajouter 100 µL de solution de substrat à un composant à chaque puits et incuber pendant 30 minutes à température ambiante. Ajouter de la solution de substrat aux puits à un rythme constant. Une coloration bleue se développe dans les puits avec échantillon positif.
11. Ajouter 100 µL de solution d'arrêt (acide sulfurique 0,36 N) à chaque puits pour arrêter la réaction enzymatique. Veiller à ajouter la solution d'arrêt aux puits dans le même ordre et au même rythme que la solution de substrat.
12. Annuler ou mettre à zéro le lecteur de plaque. Lire le D.O. de chaque puits à 450 nm (référence de 650 nm). La densité optique (D.O.) des puits doit être mesurée dans les trente minutes qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt.

Résultats

1. Calculer les valeurs D.O. moyennes pour les cupules doubles des solutions de référence AH, des contrôles AH, des réactifs à blanc et des échantillons de patient.
2. Calculer par régression polynomiale du troisième degré (recommandé), par courbe à 4 paramètres ou par report manuel de points (point à point), la courbe qui suit le mieux le D.O. moyen du 0 ng/ml (réactif à blanc) et des solutions de référence à 50, 100, 200, 500 et 800 ng/ml. Il faut établir une nouvelle courbe pour chaque série de dosages. À partir de cette courbe à six points, calculer les concentrations AH (ng/ml) dans les contrôles AH et les échantillons du patient.

Exemple de courbe de référence
À TITRE D'EXEMPLE, NE PAS UTILISER



3. Les échantillons dont la concentration AH est inférieure à 20 ng/ml peuvent être signalés en tant que « inférieurs à 20 ng/ml. » Les échantillons dont la concentration AH dépasse 800 ng/ml peuvent être signalés en tant que « supérieurs à 800 ng/ml », ou peuvent également être dilués jusqu'à 1:15 puis dosés à nouveau pour obtenir un résultat AH plus précis. Le résultat du deuxième dosage de ces échantillons doit être multiplié par le facteur de dilution pour obtenir la concentration AH finale.
4. S'assurer que tous les paramètres du contrôle qualité sont remplis (voir Contrôle qualité) avant de communiquer les résultats des tests.

Contrôle qualité

1. La valeur D.O. moyenne du réactif à blanc doit être $\leq 0,150$. Une lecture supérieure à 0,150 peut indiquer une contamination possible de la solution de substrat à un composant ou d'autres réactifs.
2. La D.O. moyenne de la solution AH de référence 500 ng/ml doit être de 0,8 ou plus.
3. Les doubles valeurs de D.O. doivent être à 20 % l'une de l'autre pour les échantillons dont la D.O. moyenne lue est supérieure à 0,3.

- Les valeurs obtenues pour les contrôles AH doivent se trouver dans les fourchettes imprimées sur chaque étiquette. Les variables d'analyse dans chaque laboratoire, y compris le matériel et la technique, peuvent influencer les contrôles ; chaque laboratoire devrait établir sa propre fourchette de valeurs acceptables pour les contrôles HA.
- Chaque laboratoire doit confirmer régulièrement les valeurs seuil et les valeurs de prévalence normales de sa population de patients. Voir les caractéristiques de performance.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Valeurs normales²⁴

Les niveaux de AH ont été mesurés chez 199 adultes sains à travers trois lots de kits AH en utilisant les directives CLSI C28-A3c. La valeur AH moyenne de cette population a été déterminée à 17,3 ng/ml avec un écart-type de 12,8 ng/ml. Les quatre valeurs les plus élevées et les plus basses ont été éliminées en utilisant la technique non-paramétrique. **La fourchette normale ≤ 56 ng/ml** inclut les 95 % d'échantillons restants.

Les données signalent qu'un contrôle supplémentaire peut être indiqué chez les patients présentant des niveaux de AH compris entre 56 et 150 ng/ml (voir les données relatives aux performances cliniques, ci-dessous). **Le point de découpage pour la prise de décision clinique³⁰ se situe à 150 ng/ml**, indiquant la présence possible d'une fibrose avancée. Une biopsie hépatique peut être indiquée chez les sujets présentant une fibrose avancée³⁰.

Performance clinique²⁴ *Stéatose hépatique non alcoolique (NASH)*

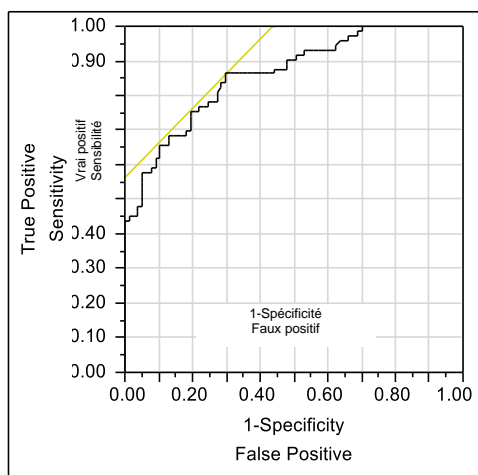
Les échantillons de sérums des patients atteints de NASH proviennent des Instituts Nationaux de la Santé (NIH) et ont été répartis en deux lots par le NIDDK : lot d'observation, n = 340 et lot de validation, n = 300. L'étude d'observation a évalué la performance clinique du dosage AH par rapport à la fibrose hépatique et un point de découpage adéquat a été établi pour la détection de la fibrose avancée dans une cohorte de patients atteints de NASH. Les données ont alors été validées au point de découpage sélectionné. Les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) ont été calculées selon la méthode de la fonction d'efficacité du récepteur (courbe ROC) en comparant les valeurs AH (ng/ml) à la présence d'une fibrose hépatique avancée (METAVIR F3-F4), évaluée par un examen histologique de spécimens de biopsie hépatique. **Le point de découpage pour la prise de décision clinique³⁰ se situe à 150 ng/ml**. Le dosage AH a affiché une VPP de 88 % et une VPN de 81,4 % pour l'identification des patients atteints d'une fibrose avancée au point de découpage.

Le tableau ci-dessous présente les caractéristiques du test du kit de test AH) 150 ng/ml

	Lot de validation
Valeur prédictive positive	88 %
Valeur prédictive négative	81,4 %

La figure suivante présente la courbe ROC (aire sous la courbe) pour évaluer la fibrose avancée (F3 et F4) chez les patients atteints de NASH :

Lot de validation :



Aire sous la courbe = 0,86070

L'aire sous la courbe pour le lot de validation est à 0,86070, étayant ainsi la performance clinique du dosage AH pour l'évaluation de la fibrose avancée chez les patients atteints de NASH.

Performance analytique²⁴

Précision :

La précision a été évaluée tel que spécifié dans les directives CLSI EP5-A2, en utilisant des valeurs échantillons de sérum hautes, modérées et basses.

	Valeurs basses	Valeurs modérées	Valeurs hautes
Valeur réelle (ng/ml)	53,5	147,1	721,7
Estimation de la répétabilité (CV %)	13,5%	9,3%	8,1%
Estimation de la précision du laboratoire (CV %)	16,2%	13,0%	14,5%
Précision d'un jour sur l'autre (CV %)	NC	5%	7%
Entre les séries, dans la journée (CV %)	11%	8%	10%

NC : NON CALCULABLE OU < 0

Reproductibilité :

Les données de reproductibilité ont été calculées conformément aux directives CLSI EP5-A2 et aux normes ISO PDTR 22971 (Practical Guide to ISO 5725-2: 1994, TC 69/SC 6.)

Le résumé des données issues de l'ensemble des sites de test est présenté ci-dessous :

	Valeurs basses	Valeurs modérées	Valeurs positives basses	Valeurs modérées Valeurs positives
Valeur réelle (ng/ml)	32,3	122,0	372,4	613,1
Estimation de la répétabilité (CV %)	7,7%	5,9%	8,6%	6,9%
Limite de répétabilité	7,0	20,2	90,1	117,8
Estimations interlaboratoires (CV %)	3,2%	3,2%	4,9%	3,6%
Estimation de la reproductibilité (CV %)	8,3%	5,0%	7,1%	5,8%
Limite de reproductibilité	7,5	17,1	73,9	100,2

Linéarité :

La linéarité du kit de test de l'acide hyaluronique a été évaluée conformément aux directives CLSI EP6-A et il a été démontré que ce test est linéaire de 20 ng/ml à 1300 ng/ml à $\pm 10\%$ dans cet intervalle.

Limite du blanc (LdB) / Limite de détection (LdD) :

Sur la base de 360 déterminations (180 blancs et 180 positifs) selon les directives CLSI EP17-A, la LdD du kit de test de AH est de 11 ng/ml avec une probabilité de 95 % d'obtention d'une réaction positive (résultat qui dépasse le LdB) à ce niveau et une probabilité de 95 % d'obtention une réaction négative sur les échantillons blancs. Une LdB de 7 ng/ml a été utilisée.

INTERFÉRENCES ET RÉACTIVITÉ CROISÉE²⁴

Les interférences potentielles du kit de test de AH ont été évaluées conformément aux directives CLSI EP7-A2, pour les composants de sérum/plasma suivants, lorsqu'ils sont ajoutés au sérum présentant des niveaux de AH faibles, modérés et élevés. Aucune interférence n'a été détectée aux niveaux ci-dessous :

Hémoglobine	200 mg/ml	20 000 mg/dl	S/O
Bilirubine conjuguée	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/L
Bilirubine libre	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/L
Triglycérides	50 mg/ml	5000 mg/dl	56,5 mmol/L

La réactivité croisée entre AH et le facteur rhumatoïde IgM a été évaluée. Il a été observé que le facteur rhumatoïde IgM, lorsqu'il est ajouté au sérum caractérisé par des niveaux faibles, modérés et élevés de AH, conformément aux directives NCCLS EP7-A2, présente une réaction croisée à <2 %, à tous les niveaux.

La réactivité croisée entre le AH et un mélange de composants de glycosaminoglycane (sulfate de chondroïtine 6, sulfate de chondroïtine 4, sulfate de chondroïtine 2-6 et sulfate de chondroïtine 4-6) a été évaluée. Il a été observé que ce mélange, lorsqu'il est ajouté au sérum caractérisé par des niveaux faibles, modérés et élevés de AH, conformément aux directives NCCLS EP7-A2, présente une réaction croisée à <2 % à tous les niveaux avec les composants de glycosaminoglycane.

LIMITES DU TEST

Les niveaux d'acide hyaluronique obtenus avec ce dosage peuvent être utilisés pour évaluer la fibrose avancée chez les patient atteints de maladie hépatique chronique. Chaque médecin doit interpréter ces résultats au vu des antécédents du patient, de son examen médical et des autres procédures de diagnostic.

Les niveaux de AH sérique sont susceptibles d'être élevés en cas d'inflammation synoviale et de destruction du cartilage, ainsi qu'observé dans l'arthrite rhumatoïde (AR), à la suite d'une production accrue et de son passage dans la circulation. On a aussi trouvé des niveaux de AH sérique élevés chez certains patients souffrant d'ostéo-arthrite (OA) plus avancée ou active, de sclérose systémique progressive (SSP) et de lupus érythémateux systémique (LES) ; on pense que la cause en est l'activité du facteur de croissance dans les cellules du tissu conjonctif et l'implication synoviale.²⁶⁻²⁸

Comme le signale la littérature,²⁶ des études montrent que l'âge a un effet accru sur les niveaux de AH chez les sujets sains, bien que cet effet soit minime. Il a été démontré que le taux d'augmentation est d'environ 0,36 ng/ml par année chez les sujets sains.

Garantie

Ce produit est garanti fonctionner ainsi que décrit dans la notice jointe au conditionnement. Corgenix, Inc. dénie toute garantie implicite d'aptitude à la vente ou de conformité à une utilisation particulière et Corgenix, Inc. ne sera en aucun cas responsable d'aucun dommage consécutif.

Pour contacter le service technique ou client aux États-Unis : téléphone 1-800-729-5661. Hors des États-Unis : téléphone 303-457-4345, fax 303-457-4519, courriel : technicalsupport@corgenix.com ; sinon, contactez un distributeur autorisé de Corgenix.

KIT DE PRUEBA DE ÁCIDO HIALURÓNICO (AH)

Para uso de diagnóstico *in vitro*

INDICACIONES

Para la determinación cuantitativa de ácido hialurónico (AH) en suero o plasma humanos. El AH se debe utilizar como marcador serológico de la fibrosis hepática junto con otra información histológica, clínica y serológica para predecir la fibrosis avanzada (Metavir F3-4) en pacientes con enfermedad hepática crónica asociada con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA).

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DEL ENSAYO

El ácido hialurónico (AH), también conocido como hialuronato, es un glicosaminoglicano – un polisacárido de alto peso molecular con un pilar sin ramificaciones, compuesto de secuencias alternadas de β -(1-4)-ácido glucorónico y dos mitades de β -(1-3)-N-acetilglucosamina. Cada dímero es considerado una unidad y tiene un peso molecular de aproximadamente 450 D. La molécula de AH puede variar en longitud desde menos de 10 a más de 1000 unidades.¹⁻⁴ El ácido hialurónico es producido principalmente por fibroblastos y otras células de tejido conectivo especializadas. Desempeña una función estructural en la matriz del tejido conjuntivo (proteoglicano) así como en diversas interacciones célula-célula. El ácido hialurónico es distribuido ampliamente por todo el cuerpo y se puede encontrar como molécula libre en el plasma y en el líquido sinovial. En el plasma, la media vida de la molécula de ácido hialurónico es, según las estimaciones, entre 5 y 6 minutos.^{3,4} El AH se encuentra en el líquido sinovial en altas concentraciones y es responsable de la retención normal de agua y la lubricación de la articulación. El AH sinovial puede pasar al plasma por medio del sistema linfático.⁵ En la circulación, los niveles de AH son mantenidos por un eficaz mecanismo de extracción, dependiente del receptor, presente en la células endoteliales sinusoidales (CES) del hígado y por la acción enzimática de la hialuronidasa.^{6,7}

Los niveles de AH en el suero pueden elevarse en diversas enfermedades del hígado, caracterizadas por fibrosis y cirrosis, debido a una reducción de la extracción hepática y/o un incremento de la producción hepática de AH durante la inflamación del hígado.^{8,9} El incremento de los niveles de AH ha mostrado una mejor correlación con el grado de daño histopatológico al hígado que las pruebas convencionales de la función del hígado, incluidas ALT/AST, la fosfatasa alcalina y la bilirrubina.^{10,11} Se ha sugerido que la determinación de los niveles de AH en el suero puede ser útil para distinguir un hígado cirrótico de uno no cirrótico, para evaluar el grado de fibrosis del hígado y para monitorizar la función de este órgano.¹²⁻¹⁶ También se ha mostrado que los niveles de AH reflejan el grado de fibrosis hepática en pacientes con hepatitis C crónica y puede ser útil para monitorizar la respuesta a la interferencia con el tratamiento alfa.¹⁷⁻¹⁹ Se ha encontrado una correlación similar en pacientes con cirrosis²⁰ derivada del alcohol y cirrosis biliar primaria.¹⁰ También se ha mostrado que los niveles de AH son una marca incipiente de daño en el hígado debido a agentes tóxicos tales como el etanol, acetaminofén y lipopolisacárido bacteriano, como cambios patológicos del CES en respuesta a estos agentes preceden a los cambios patológicos de los hepatocitos.^{13,21}

EHNA es un tipo de enfermedad hepática grasa no alcohólica (EHGNA) con una prevalencia estimada del 3 al 5 % en la población general. Se define como la presencia de esteatosis e inflamación hepática con lesión del hepatocito (hinchazón) con o sin fibrosis.³⁰ Los datos clínicos sugieren que se observan elevados niveles de AH en pacientes con EHNA que presentan fibrosis hepática.²⁴

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La determinación del AH mide los niveles de AH y se realiza como un ensayo de proteína de unión ligada a enzimas que utiliza una molécula de captura conocida como proteína de unión del ácido hialurónico (HABP).^{22, 23, 25} La HABP funciona como un receptor específico para el AH e *in vivo* une el AH con la proteína del núcleo y otros glicosaminoglicanos para formar complejos de agregados proteoglicanos. En este ensayo, la HABP que ocurre naturalmente se aísla por purificación por afinidad del cartílago nasal bovino y se tapiza en micropocillos para capturar específicamente el AH. También se utiliza una versión conjugada con una enzima de HABP para medir el AH capturado del suero o plasma humano con los micropocillos tapizados con HABP.²⁸⁻²⁹ La HABP se une, bloquea y estabiliza en el fondo y los laterales de los pocillos de una placa de valoración. Las muestras de suero o plasma del paciente diluidas se incuban en los pocillos, lo que permite que cualquier AH disponible se una a la HABP inmovilizada. A continuación, se aclaran las placas de las moléculas de suero o plasma sin unir. El AH unido se cuantiza utilizando una segunda molécula de HABP conjugada con una enzima (peroxidasa de rábano).

A continuación, toda HAPB conjugada y sin unir se aclara. La HAPB conjugada y unida se incuba con un sistema de sustrato/cromóforo. La evolución cromática final se mide espectrofotométricamente en unidades de densidad óptica (unidades DO). Las concentraciones de AH del suero o plasma de un paciente se determinan a partir de una curva de referencia que resulta de unidades DO de cinco muestras de referencia de AH de concentración de AH conocida y 0 ng/ml (blanco de reactivo).

REACTIVOS


Consérvelos a entre 2 y 8 °C. No los congele.

Cada equipo de determinación del AH de 96 micropocillos contiene los siguientes reactivos (los volúmenes pueden variar dependiendo del tamaño y la configuración del equipo):

- 12 tiras de 8 micropocillos recubiertas de HAPB estabilizadas, con gradilla.
- 1 botella (57 ml) de tampón de reacción (solución azul).
- 1 frasco (0,5 ml) de 50 ng/ml de solución de referencia de AH.
- 1 frasco (0,5 ml) de 100 ng/ml de solución de referencia de AH.
- 1 frasco (0,5 ml) de 200 ng/ml de solución de referencia de AH.
- 1 frasco (0,5 ml) de 500 ng/ml de solución de referencia de AH.
- 1 frasco (0,5 ml) de 800 ng/ml de solución de referencia de AH.
- 1 botella (13 ml) de solución de HAPB conjugada con HRP (solución roja).
- 1 botella (13 ml) de solución de sustrato de un componente (contiene 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno, estabilizado).
- 1 envase de 15 ml de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N).
- 1 botella (30 ml) de concentrado para lavado (solución de tampón fosfato salino [PBS] 33x); 30 ml se reconstituyen a 1 litro de PBS 0,01M; pH 7,35 ± 0,1.
- 1 vial (0,5 ml) de AH de alto control (el rango aceptable está impreso en la etiqueta del vial)
- 1 vial (0,5 ml) de AH de control moderado (el rango aceptable está impreso en la etiqueta del vial)
- 1 vial (0,5 ml) de AH de control bajo (el rango aceptable está impreso en la etiqueta del vial)

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

Para uso de diagnóstico *in vitro*

1. Las muestras de plasma o suero del paciente que quieran evaluarse con esta prueba, como todos los derivados de sangre humana, deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
2. No conecte la pipeta con la boca.
3. No fume, coma ni beba en áreas en las que se están manipulando muestras o reactivos del kit.
4. Use guantes desechables mientras manipula los reactivos del kit y lávese las manos minuciosamente después.
5. Determinados componentes están etiquetados con lo siguiente:
Irritante para los ojos (R 36). Evite el contacto con la piel (S 24). Evite el contacto con los ojos (S 25). En caso de que se produzca un contacto con los ojos, enjuáguelos inmediatamente con cantidades abundantes de agua y obtenga atención médica (S 26). Si se traga, obtenga atención médica inmediata y muestre este contenedor o etiqueta (S 46). Advertencia .

RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

El suero o el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) plasma son las matrices de muestra preferidas. La sangre debe extraerse por venopunción. El suero o plasma deben separarse de las células por centrifugación. Si no se analizan inmediatamente, las muestras deben almacenarse entre 2 y 8 °C. Cuando las muestras deban almacenarse durante más de 72 horas, deben congelarse a -20 °C o menos. Las muestras que contienen materia de partículas visibles deberán clarificarse por medio de centrifugación antes del ensayo.

INSTRUCCIONES DE USO

Materiales proporcionados

Prueba de ácido hialurónico; véase una lista completa en "Reactivos".

Materiales necesarios pero no suministrados

- Agua para reactivos para preparar solución de lavado PBS (aproximadamente 1 l)
- Cilindros graduados
- Pipetas de precisión capaces de dispensar entre 5 y 1000 microlitros, con puntas apropiadas
- Artículos misceláneos variados de vidrio o plástico apropiados para la manipulación de pequeños volúmenes
- Matraz, frasco o probeta, 1 litro

- Botellas de lavado, preferentemente con la punta parcialmente cortada para proporcionar un flujo amplio, o un sistema automático o semiautomático de lavado de placas
- Pipetas multicanal capaces de dispensar a 8 pocillos simultáneamente (muy recomendables)
- Tubos de microdilución y soporte de tubos de microdilución de 96 pocillos para diluciones de muestra
- Espectrofotómetro lector de placas capaz de leer la absorbancia a 450 nm (con referencia de 650 nm si se encuentra disponible)
- Se recomienda el uso de guantes desechables sin talco

Notas del procedimiento

1. Permita que las muestras de los pacientes y los reactivos del equipo alcancen la temperatura ambiente (20 - 26 °C). Mezcle bien antes de usar; evite la formación de espuma. Devuelva todas las muestras y reactivos sin usar al almacenamiento refrigerado (entre 2 y 8 °C) en cuanto sea posible.
2. Todas las muestras, incluidas las soluciones de referencia y los controles, deben ensayarse en receptáculos duplicados.
3. Prepare dos pocillos como blanco de reactivos. El tampón de reacción (sin suero) se usa para que el blanco de reactivo sirva como una solución de referencia de 0 ng/ml de AH.
4. El lector de placas debe programarse para ponerse a cero o borrarse con respecto a aire.
5. Una buena técnica de lavado es crucial para el rendimiento óptimo del ensayo. El lavado adecuado se realiza mejor mediante un chorro enérgico de solución de lavado hacia la parte inferior de los micropocillos, apretando una botella de plástico de boca ancha. También puede utilizarse un sistema de lavado automático de microplacas.
6. **IMPORTANTE:** Si no se retiran adecuadamente los restos de solución de lavado, la solución de sustrato puede desarrollar un color inconsistente.
7. Siempre que sea posible, utilice una pipeta multicanal capaz de administrar las soluciones a 8 pocillos simultáneamente. Así se acelera el proceso y se proporcionan tiempos de incubación y reacción más uniformes para todos los pocillos.
8. Es importante la medición cronométrica cuidadosa de todos los pasos. Para todas las incubaciones, el inicio del período de incubación comienza al acabar de añadir las muestras o los reactivos.
9. El añadido de todas las muestras y reactivos debe realizarse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
10. Las temperaturas de incubación diferentes a la temperatura ambiente normal (entre 20 y 26 °C) pueden hacer que se obtengan resultados inexactos.
11. Evite contaminar los reactivos cuando abra y retire alícuotas de los frascos primarios.
12. No debe utilizarse Tween 20 ni otros detergentes en este ensayo.
13. No utilice los componentes del kit después de su fecha de caducidad.
14. No utilice reactivos provenientes de equipos con diferentes números de lote.

Preparación del reactivo

Solución de lavado (PBS): Diluya 30 ml de concentrado para lavado PBS 33x a 1 litro con agua para reactivos. El pH de la solución final debe ser de 7,35 + 0,1. Conserve la solución PBS sin usar entre 2 y 8 °C. Deseche la solución si muestra signos de contaminación microbiana o de otro tipo.

Procedimiento del ensayo

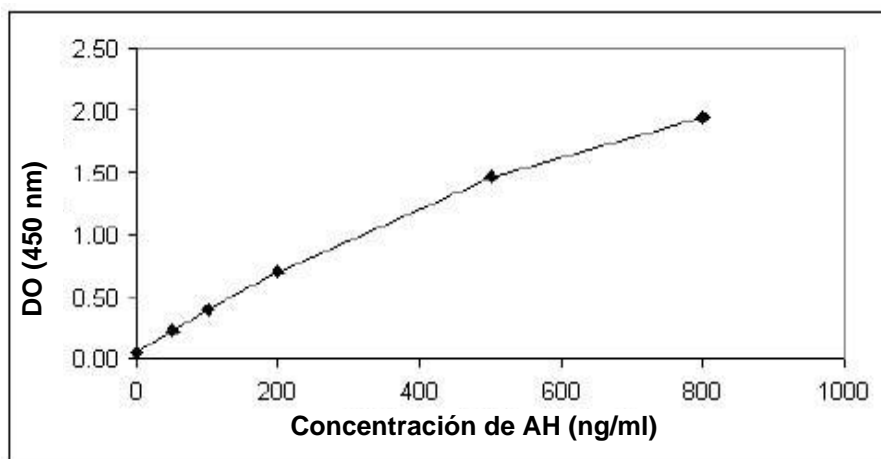
1. Las soluciones de referencia para el AH de ensayo, los controles de AH, y blancos de reactivos por duplicado. También se recomiendan las determinaciones por duplicado para las muestras de pacientes. Para el blanco de reactivo se usa un tampón de reacción sin suero, que representa la solución de referencia de AH de 0 ng/ml. El blanco de reactivo será tratado de la misma forma que las soluciones de referencia, los controles o las muestras de paciente en los pasos subsiguientes del ensayo.
2. Retire de la gradilla las tiras de micropocillos que no se vayan a utilizar en el proceso y vuelva a sellar la bolsita de aluminio.
3. Prepare soluciones de referencia de AH, controles de AH y muestras de paciente, agregando 1 parte de la solución o muestra a 10 partes de tampón de reacción (solución azul). Por ejemplo, 30 µl de muestra añadidos a 300 µl de tampón de reacción proporcionarán el suficiente volumen para someter a prueba el duplicado.
4. Añada 100 µl de soluciones de referencia de AH diluido, controles de AH, muestras de paciente y tampón de reacción (para el blanco reactivo) a los micropocillos apropiados.
5. Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (20 - 26 °C).

6. Después de completar la incubación, invierta cuidadosamente los micropocillos y deseche el contenido en un recipiente adecuado. No permita que las muestras contaminen los demás micropocillos. Lave los pocillos 4 veces con solución de lavado de trabajo (PBS), llenando los pocillos completamente. Invierta los micropocillos entre cada lavado para vaciar el fluido. Haga un movimiento brusco de muñeca para sacudir el líquido de modo que se desprenda de los pocillos. Dé golpecitos en las placas o séquelas sobre papel absorbente para extraer el tampón de lavado residual. No deje que los pocillos se sequen en los intervalos entre pasos.
7. Añada 100 µl de solución de HAPB conjugada con HRP (solución roja) a todos los pocillos.
8. Incube durante 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Después de que se haya terminado la incubación, invierta los micropocillos con cuidado y vacíe la solución conjugada. Lávelos 4 veces con PBS y golpéelos ligeramente o séquelos con papel absorbente como se describe en el paso 6. No permita que los pocillos se sequen por completo.
10. Añada 100 µl de solución de sustrato de un componente a cada pocillo e incube durante 30 minutos a temperatura ambiente. Añádase solución de sustrato a los pocillos a velocidad uniforme. Se desarrollará un color azul en los pocillos con muestras positivas.
11. Añada 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,36 N) a cada pocillo para detener la reacción enzimática. Asegúrese de añadir solución de parada a los pocillos en el mismo orden y a la misma velocidad que la solución de sustrato.
12. Borre el lector de placas o póngalo a cero. Lea la DO de cada pocillo a 450 nm (referencia de 650 nm). La densidad óptica (DO) de los pocillos debe medirse dentro del plazo de treinta minutos después de la adición de solución de parada.

Resultados

1. Calcule los valores medios de OD para los pozos duplicados de las soluciones de referencia de AH, controles de AH, blancos de reactivos y muestras de paciente.
2. Usando regresión polinómica de tercer orden (recomendada), la curva de 4 parámetros o trazado manual (punto a punto), calcule la curva de mejor ajuste usando las DO medias de las soluciones de referencia de 0 ng/ml (reactivo testigo) y de 50, 100, 200, 500 y 800 ng/ml. Con cada proceso de ensayo debe trazarse una nueva curva. De esta curva de seis puntos, calcule las concentraciones de AH resultantes (ng/ml) en los controles de AH y muestras de paciente.

Ejemplo de curva de referencia
SÓLO COMO EJEMPLO, NO LO USE



3. Las muestras con concentraciones de AH inferiores a 20 ng/ml pueden especificarse como "menos de 20 ng/ml". Las muestras con concentraciones de AH de más de 800 ng/ml pueden especificarse como "más de 800 ng/ml" o pueden diluirse hasta 1:15 y volverse a analizar para obtener resultados de AH más precisos. Los resultados del segundo ensayo con estas muestras deben multiplicarse por el factor de dilución para obtener la concentración final de AH.
4. Asegúrese de que todos los parámetros de control de calidad se hayan cumplido (véase "Control de calidad") antes de informar sobre los resultados de las pruebas.

Control de calidad

1. El valor DO medio del blanco reactivo debería ser $\leq 0,150$. Las lecturas de más de 0,150 pueden indicar posible contaminación del sustrato de un componente u otros reactivos.
2. El valor medio de DO de la solución de referencia de AH de 500 ng/ml debe ser 0,8 o mayor.

- Los valores de las DO por duplicado deben estar a menos de un 20 % uno del otro en el caso de muestras con una lectura media de DO de más de 0,3.
- Los valores obtenidos para los controles de AH deberían estar dentro de los rangos impresos en la etiqueta de cada contenedor. Las pruebas de variables en cada laboratorio, incluidos el equipo y la técnica, pueden influir en la recuperación del control; cada laboratorio debería considerar el establecimiento de su propio rango aceptable para los controles de AH.
- Cada laboratorio debe confirmar periódicamente los valores umbral y de prevalencia en su población de pacientes. Ver características de rendimiento.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Valores esperados²⁴

Los niveles de AH se midieron en 199 adultos sanos en tres lotes del kit de AH utilizando CLSI C28-A3c. Se determinó que el valor medio de AH de esta población fue de 17,3 ng/ml, con una desviación estándar de 12,8 ng/ml. Se eliminaron los cuatro valores mayores y menores utilizando la técnica no paramétrica. **El intervalo normal resultante de ≤ 56 ng/ml** incluye el restante 95 % de las muestras.

Los datos sugieren que puede indicarse más monitorización en pacientes con niveles de AH entre 56 y 150 ng/ml (ver a continuación los datos de rendimiento clínico). El valor de corte para la decisión clínica³⁰ es 150 ng/ml, indicando el potencial para la fibrosis avanzada. La biopsia hepática puede indicarse en individuos con fibrosis avanzada³⁰.

Rendimiento clínico²⁴ *Esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)*

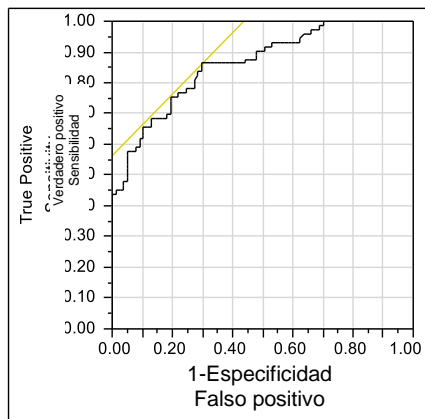
Las muestras de suero de pacientes con EHNA se obtuvieron del Instituto Nacional de Salud (NIH) – división NIDDK en dos conjuntos distintos: conjunto de entrenamiento, n = 340 y conjunto de validación, n = 300. El estudio de entrenamiento evaluó el rendimiento clínico del ensayo de AH frente a la fibrosis hepática y se estableció un valor de corte apropiado para detectar la fibrosis avanzada en una cohorte de EHNA. A continuación se validaron los datos en el valor de corte seleccionado. Se calcularon los valores predictivos porcentuales positivos (PPV) y negativos (NPV) utilizando el método de curvas de característica operativa del receptor (ROC) comparando los valores de AH (ng/ml) con la presencia de fibrosis hepática avanzada (METAVIR F3-F4), evaluado en el examen histológico de las muestras de biopsia hepática. **El valor de corte para la decisión clínica³⁰ es 150 ng/ml.** El ensayo de AH mostró un PPV de 88,0 % y NPV de 81,4 % para identificar a pacientes con fibrosis avanzada en el valor de corte.

La tabla inferior describe las características de la prueba del kit de prueba de AH con 150 ng/ml:

	Conjunto de validación
Valor predictivo positivo	88,0 %
Valor predictivo negativo	81,4 %

La siguiente figura muestra la ROC (zona bajo la curva) para evaluar la fibrosis avanzada (F3 y F4) en pacientes con EHNA:

Conjunto de validación:



Zona bajo la curva = 0,86070

La zona bajo la curva para el conjunto de validación es 0,86070, lo que avala el rendimiento clínico del ensayo de AH para evaluar la fibrosis avanzada en pacientes con EHNA.

Rendimiento analítico²⁴

Precisión:

Se evaluó la precisión como se especifica en CLSI EP5-A2 utilizando muestras de suero altas, moderadas y bajas.

	Baja	Moderada	Alta
Valor real (ng/ml)	53,5	147,1	721,7
Estimación de repetibilidad (%CV)	13,5 %	9,3 %	8,1 %
Estimación de precisión en el laboratorio (%CV)	16,2 %	13,0 %	14,5 %
Precisión entre días (%CV)	NC	5 %	7 %
Entre series, en el día (%CV)	11 %	8 %	10 %

NC: No calculable o <0

Reproducibilidad:

Los datos de reproducibilidad se calcularon conforme a CLSI EP5-A2 e ISO PDTR 22971 (Practical Guide to ISO 5725-2: 1994, TC 69/SC 6.)

El resumen de los datos de todos los lugares de prueba se ofrece a continuación:

	Baja	Moderada	Positiva baja	Moderada Positiva
Valor real (ng/ml)	32,3	122,0	372,4	613,1
Estimación de repetibilidad (%CV)	7,7 %	5,9 %	8,6 %	6,9 %
Límite de repetibilidad	7,0	20,2	90,1	117,8
Estimación entre laboratorios (%CV)	3,2 %	3,2 %	4,9 %	3,6 %
Estimación de reproducibilidad (%CV)	8,3 %	5,0 %	7,1 %	5,8 %
Límite de reproducibilidad	7,5	17,1	73,9	100,2

Linealidad:

La linealidad en el kit de prueba de ácido hialurónico se evaluó como se especifica en CLSI EP6-A y ha demostrado ser lineal desde 20 ng/ml hasta 1300 ng/ml dentro de ± 10 % en este intervalo.

Límite para blancos (LOB)/Límite de detección (LOD):

Según 360 determinaciones (180 blanco y 180 positivo) utilizando CLSI EP17-A, el LOD para el kit de prueba de AH es 11 ng/ml con un 95 % de probabilidad de obtener una respuesta positiva (un resultado que supera el LOB) en este nivel y un 95 % de probabilidad de obtener una respuesta negativa en muestras de blanco. Se utilizó un LOB de 7 ng/ml.

INTERFERENCIA Y REACTIVIDAD CRUZADA²⁴

Se evaluó la interferencia en el kit de prueba de AH conforme a CLSI EP7-A2. Los siguientes constituyentes de suero/plasma, cuando se añaden a suero con niveles de AH bajos, moderados y altos. No se encontraron interferencias con los siguientes niveles:

Hemoglobina	200 mg/ml	20,000 mg/dl	N/A
Bilirrubina conjugada	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/l
Bilirrubina libre	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/l
Triglicéridos	50 mg/ml	5000 mg/dl	56,5 mmol/l

Se evaluó la reactividad cruzada entre el AH y el factor reumatoide IgM. El factor reumatoide IgM, cuando se añade a suero con niveles bajos, moderados y altos de AH según NCCLS EP7-A2, resultaba tener una reacción cruzada con <2 % en todos los niveles con el factor reumatoide IgM.

Se evaluó la reactividad cruzada entre el AH y una mezcla de compuestos de glicosaminoglicano (6-sulfato de condroitina, 4-sulfato de condroitina, 2-condroitina, 6-sulfato y 4 y 6-sulfato de condroitina). Esta mezcla, cuando se añade a suero con niveles bajos, moderados y altos de AH según NCCLS EP7-A2, resultaba tener una reacción cruzada con <2 % en todos los niveles con compuestos del glicosaminoglicano.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Los niveles de ácido hialurónico obtenidos con este análisis pueden ser utilizados para evaluar la fibrosis avanzada en pacientes con enfermedad hepática crónica. Cada médico debe interpretar estos resultados basándose en los antecedentes del paciente, datos obtenidos en la exploración física y otros procedimientos diagnósticos.

Los niveles séricos del AH pueden elevarse durante la inflamación sinovial y la destrucción de cartílago, como se ha visto en la artritis reumatoide (AR), debido al aumento de su producción y a su paso a la circulación. También se ha informado de niveles séricos elevados de AH en algunos pacientes con osteoartritis (OA) más avanzada o activa, esclerosis sistémica progresiva (ESP) y lupus eritematoso diseminado (LED), y se cree que son provocados por la actividad del factor de crecimiento en las células del tejido conjuntivo y por la inflamación sinovial.²⁶⁻²⁸

Como se indica en la bibliografía²⁶, nuestros estudios muestran que la edad tiene mayor efecto sobre los niveles de AH en individuos sanos aunque el efecto fue mínimo. Se demostró que la frecuencia de aumento fue de aproximadamente 0,36 ng/ml por año en individuos sanos.

Garantía

Este producto está garantizado para funcionar como se describe en el encarte del producto. Corgenix, Inc. niega que exista cualquier garantía implícita o de comerciabilidad o de idoneidad para un uso particular, y en ningún caso Corgenix, Inc. será responsable de daños consecuentes.

Para contactar con el departamento técnico o de servicio al cliente en Estados Unidos, llame al teléfono 1-800-729-5661. Fuera de los EE.UU., llame al 303-457-4345, envíe un fax al 303-457-4519, envíe un correo electrónico a: technicalsupport@corgenix.com o póngase en contacto con un distribuidor autorizado de Corgenix.

KIT PER IL DOSAGGIO DELL'ACIDO IALURONICO (HA)Per uso diagnostico *in vitro***USO PREVISTO**

Dosaggio enzimatico della proteina legante per la determinazione dell'acido ialuronico (HA) nel siero o nel plasma umano. L'acido ialuronico è indicato per l'uso come marker sierologico della fibrosi epatica in combinazione con altri dati sierologici e clinici per la previsione di fibrosi avanzata (Metavir F3-4) in pazienti affetti da malattia del fegato cronica associata a epatopatia steatosica non alcolica (NASH).

COMPENDIO E SPIEGAZIONE DEL DOSAGGIO

L'acido ialuronico (HA), noto anche come ialuronato o ialurone, è un glicosaminoglicano - un polisaccaride di elevato peso molecolare con una catena non ramificata costituita da sequenze che si ripetono nell'ordine di legami β -(1-4)-acido glucuronico e β -(1-3)-N-acetilglucosamina. Ciascun dimero costituisce una unità e ha un peso molecolare di circa 450 dalton. La molecola di HA può avere una lunghezza che varia da meno di 10 ad oltre 1.000 unità.¹⁻⁴ L'HA è prodotto principalmente da fibroblasti e altre cellule specializzate di tessuto connettivo. L'HA ricopre un ruolo strutturale nella matrice di tessuto connettivo (proteoglicano) e prende parte a varie interazioni da cellula a cellula. L'HA è ampiamente distribuito in tutto il corpo e può essere rilevato come molecola libera nel plasma e nel liquido sinoviale. Nel plasma l'emivita della molecola di HA è stata stimata in circa 5-6 minuti.^{3,4} L'HA è presente in elevate concentrazioni nel liquido sinoviale ed è responsabile della normale ritenzione idrica e della lubrificazione delle articolazioni. L'HA sinoviale può passare nel plasma attraverso il sistema linfatico.⁵ I livelli di HA in circolazione vengono mantenuti stabili da un meccanismo efficiente di rimozione dipendente dai recettori presente nelle cellule endoteliali sinusoidali del fegato e dall'azione enzimatica della ialuronidasi.^{6,7}

I livelli di HA nel siero possono essere elevati in varie malattie del fegato caratterizzate da fibrosi e cirrosi epatica, dovute alla riduzione di HA nel fegato e/o ad una maggiore produzione epatica di HA durante l'infiammazione epatica.^{8,9} Maggiori livelli di HA hanno dimostrato una migliore correlazione con il livello di danno istopatologico al fegato rispetto ai normali test della funzione epatica tra cui l'ALT/AST, la fosfatasi alcalina e la bilirubina.^{10,11} È stato proposto che la determinazione dei livelli di HA nel siero potrebbe essere utile nella distinzione tra fegato cirrotico e non cirrotico, nella valutazione del grado di fibrosi epatica e nel monitoraggio della funzione epatica.¹²⁻¹⁶ È stato inoltre dimostrato che i livelli di HA riflettono l'estensione della fibrosi epatica nei pazienti affetti da epatite C cronica e possono essere utili nel monitoraggio della risposta al trattamento con interferone alfa.¹⁷⁻¹⁹ Una correlazione simile è stata riscontrata in pazienti affetti da cirrosi alcolica²⁰ e da cirrosi biliare primitiva.¹⁰ È stato anche dimostrato che i livelli di HA sono un marker precoce di danno epatico da agenti tossici quali etanolo, acetaminofene e lipopolisaccaride batterica, in quanto le modifiche patologiche del SEC in risposta a tali agenti precedono le modifiche patologiche degli epatociti.^{13,21}

NASH è un tipo di steatosi epatica non alcolica (NAFLD) con una prevalenza stimata del 3-5% nella popolazione generale. È definita come la presenza di steatosi epatica e infiammazione con lesione delle cellule epatiche (degenerazione balloniforme) con o senza fibrosi.³⁰ I dati clinici suggeriscono che livelli elevati di HA sono stati rilevati in pazienti affetti da NASH con fibrosi epatica.²⁴

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il kit per il dosaggio dell'HA consente di misurare i livelli di HA e viene impiegato come un dosaggio enzimatico della proteina legante che utilizza una molecola di cattura denominata proteina legante dell'acido ialuronico (HABP).^{22, 23, 25} L'HABP funziona come un recettore specifico per l'HA e collega l'HA *in vivo* con la proteina del core e altri glicosaminoglicani per formare complessi aggregati di proteoglicani. In questo dosaggio, la HABP naturale viene isolata dalla cartilagine nasale bovina tramite purificazione per affinità e rivestita a micropozzetti per catturare in modo specifico l'HA. Inoltre, una versione enzima-coniugata di HABP viene usata per misurare la quantità di HA catturata dal plasma o dal siero umano dai micropozzetti rivestiti di HABP.²⁸⁻²⁹ La HABP si lega, si inibisce e si stabilizza sul fondo e sui bordi dei pozzetti di una piastra microtiter. I campioni diluiti di siero o di plasma del paziente vengono incubati nei pozzetti consentendo all'HA disponibile di legarsi alla HABP immobilizzata. Le piastre vengono quindi risciacquate per eliminare tutte le molecole non legate di plasma o siero. La quantità di HA legato viene misurata utilizzando una seconda molecola HABP coniugata a un enzima (perossidasi di rafano). Ogni molecola HBAP coniugata non legata viene quindi eliminata tramite risciacquo.

La HABP coniugata legata viene incubata con un sistema di substrato cromoforo. Lo sviluppo cromatico finale viene misurato in spettrofotometria in unità di densità ottica (DO). Le concentrazioni di HA nel siero o nel plasma del paziente vengono stabilite in base a una curva di riferimento generata dalle unità di densità ottica relative a cinque campioni di concentrazione di HA nota e 0 ng/ml (bianco reagente).

REAGENTI

Conservare a 2-8 °C. Non congelare.


Ciascun kit per il dosaggio dell'HA da 96 micropozzetti contiene i seguenti reagenti (i volumi possono variare a seconda della misura e della configurazione del kit):

- 12 strisce di micropozzetti con 8 micropozzetti rivestiti di HABP stabilizzata, con telaio.
- 1 flacone (57 ml) di tampone di reazione (soluzione blu).
- 1 fiala (0,5 ml) di calibratore HA da 50 ng/ml.
- 1 fiala (0,5 ml) di calibratore HA da 100 ng/ml.
- 1 fiala (0,5 ml) di calibratore HA da 200 ng/ml.
- 1 fiala (0,5 ml) di calibratore HA da 500 ng/ml.
- 1 fiala (0,5 ml) di calibratore HA da 800 ng/ml.
- 1 flacone (13 ml) di soluzione HABP coniugata con HRP (soluzione rossa).
- 1 flacone (13 ml) di soluzione di substrato mono-componente (contiene 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e perossido di idrogeno, stabilizzata).
- 1 flacone (15 ml) di soluzione di arresto (acido solforico 0,36 N).
- 1 flacone (30 ml) di concentrato di lavaggio [33x soluzione fisiologica tamponata con fosfato (PBS)]; 30 ml che vanno ricostituiti a 1 litro di PBS 0,01M, pH 7,35 ± 0,1.
- 1 fiala (0,5 ml) di Controllo Alto HA (il range accettabile è stampato sull'etichetta della fiala)
- 1 fiala (0,5 ml) di Controllo Moderato HA (il range accettabile è stampato sull'etichetta della fiala)
- 1 fiala (0,5 ml) di Controllo Basso HA (il range accettabile è stampato sull'etichetta della fiala)

AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per uso diagnostico *in vitro*

1. I campioni di siero o plasma dei pazienti da analizzare con questo test, come tutti gli emoderivati di origine umana, devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo.
2. Non pipettare con la bocca.
3. Non fumare, mangiare o bere nelle aree in cui si maneggiano i campioni o i reagenti del kit.
4. Indossare guanti monouso quando si maneggiano i reagenti del kit e lavarsi bene le mani subito dopo.
5. Le seguenti informazioni sono riportate sulle etichette di alcuni componenti:
Irritante per gli occhi (R 36). Evitare il contatto con la cute (S 24). Evitare il contatto con gli occhi (S 25). In caso di contatto con gli occhi risciacquare immediatamente con acqua abbondante e rivolgersi a un medico (S 26). In caso di ingestione, rivolgersi immediatamente a un medico e mostrare questo contenitore o l'etichetta (S 46).

Avvertimento .

PRELIEVO E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il siero o l'acido etilendiaminotetracetico (EDTA) plasma sono le matrici di campione preferenziali. Il sangue deve essere prelevato tramite venopuntura. Il siero o il plasma devono essere separati dalle cellule per centrifugazione. Se non vengono analizzati immediatamente, i campioni devono essere conservati a una temperatura di 2-8 °C. Se i campioni devono essere conservati per oltre 72 ore, è necessario congelarli a -20 °C o a temperature inferiori. I campioni contenenti materiale particolato visibile devono essere centrifugati prima dell'analisi.

ISTRUZIONI PER L'USO

Materiali forniti

Kit per dosaggio dell'acido ialuronico; per un elenco completo, vedere "Reagenti".

Materiali richiesti ma non forniti

- Acqua distillata o demineralizzata per la preparazione della soluzione di lavaggio PBS (circa 1 l)
- Cilindri graduati
- Pipette di precisione in grado di erogare quantità comprese tra 5 e 1000 microlitri, con le punte appropriate
- Vari contenitori di vetro o plastica idonei per il maneggiamento di piccoli volumi
- Beuta, flacone o cilindro graduato da 1 litro
- Flaconi di lavaggio, preferibilmente con la punta parzialmente accorciata per ottenere un flusso abbondante o un sistema di lavaggio automatico o semi-automatico delle piastre

- Pipette multicanale con capacità di erogazione in 8 pozzetti simultaneamente (raccomandate)
- Provette per microdiluizione e portaprovette per microdiluizione in 96 pozzetti per la diluizione dei campioni
- Spettrofotometro per piastra in grado di rilevare l'assorbanza a 450 nm (con riferimento a 650 nm, se possibile)
- Guanti monouso, preferibilmente senza talco

Note procedurali

1. Attendere che i campioni dei pazienti e i reagenti del kit raggiungano la temperatura ambiente (20-26 °C). Miscelare bene prima dell'uso; evitare la formazione di schiuma. Riportare tutti i campioni e i reagenti non utilizzati nel congelatore (2-8 °C) quanto prima.
2. Tutti i campioni, comprese le soluzioni di riferimento e i controlli, vanno dosati in pozzetti duplicati.
3. Predisporre due pozzetti come bianco reagente. Per il bianco reagente si usa il tampone di reazione senza siero, che agisce da calibratore HA da 0 ng/ml.
4. Il lettore di piastre va azzerato contro l'aria.
5. Una buona tecnica di lavaggio è fondamentale per la riuscita ottimale del dosaggio. Per ottenere un lavaggio adeguato, dirigere un getto forte di soluzione di lavaggio verso il fondo dei micropozzetti usando una bottiglia di plastica morbida a punta larga. È possibile usare anche un sistema di lavaggio automatico per le piastre.
6. **IMPORTANTE:** se non si rimuovono adeguatamente eventuali residui di soluzione di lavaggio, lo sviluppo cromatico della soluzione di substrato potrebbe essere non uniforme.
7. Se possibile, utilizzare una pipetta multicanale in grado di effettuare la dispensazione simultanea in 8 pozzetti. Ciò rende più rapida la procedura e fornisce tempi di incubazione e di reazione più uniformi per tutti i pozzetti.
8. È importante controllare attentamente la durata di tutte le fasi. Per tutte le incubazioni, il periodo di incubazione inizia non appena si termina l'aggiunta del campione o del reagente.
9. L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti va eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.
10. Se l'incubazione avviene ad una temperatura diversa dalla temperatura ambiente (20-26 °C) si potrebbero ottenere risultati non accurati.
11. Evitare di contaminare i reagenti quando si aprono e si rimuovono le aliquote dalle fiale principali.
12. Per questo dosaggio, non utilizzare Tween 20 o detergenti di altro tipo.
13. Non utilizzare i componenti del kit oltre la loro data di scadenza.
14. Non usare componenti del kit appartenenti a kit di lotti diversi.

Preparazione dei reagenti

Soluzione di lavaggio (PBS): diluire 30 ml di concentrato di lavaggio PBS 33x con acqua distillata o demineralizzata in modo da ottenere 1 litro di soluzione. Il pH della soluzione finale deve essere pari a $7,35 \pm 0,1$. Conservare la soluzione PBS non utilizzata a 2-8 °C. Gettare la soluzione se mostra segni di contaminazione microbica o di altro tipo.

Procedura di dosaggio

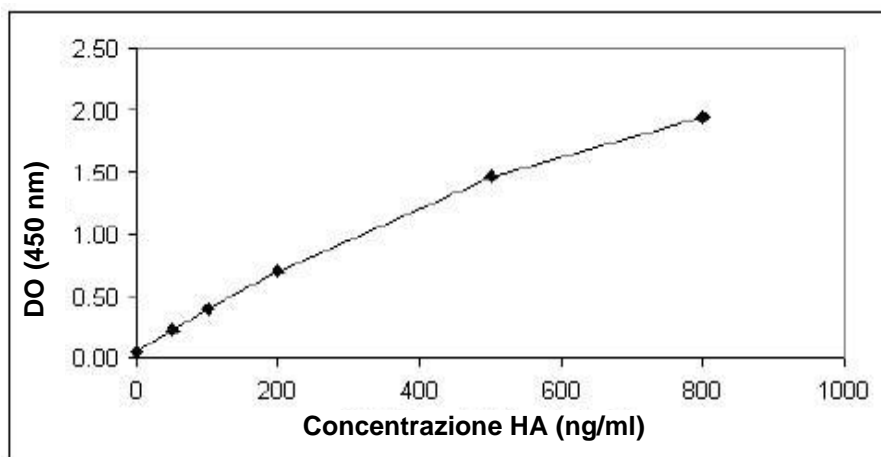
1. Analizzare le soluzioni di riferimento HA, i controlli HA e il bianco reagente in duplicato. Le determinazioni in duplicato si raccomandano anche per i campioni del paziente. Per il bianco reagente si usa il tampone di reazione senza siero, che rappresenta il calibratore HA a 0 ng/ml. Nelle successive fasi di dosaggio, il bianco reagente sarà trattato allo stesso modo delle soluzioni di riferimento, dei controlli o dei campioni del paziente.
2. Staccare dal telaio tutte le strisce di micropozzetti non utilizzate e riporle nella busta in dotazione.
3. Preparare soluzioni di riferimento HA, controlli HA e campioni del paziente aggiungendo 1 parte della soluzione o del campione a 10 parti di tampone di reazione (soluzione blu). Ad esempio, 30 µl di campione aggiunti a 300 µl di tampone di reazione costituiranno un volume sufficiente per un test in duplicato.
4. Aggiungere 100 µl di soluzioni di riferimento HA diluite, controlli HA, campioni del paziente e il tampone di reazione (per il bianco reagente) nei micropozzetti appropriati.
5. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (20-26 °C).
6. Al termine dell'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti e versare il contenuto in un apposito contenitore. Evitare la contaminazione degli altri micropozzetti con i campioni. Lavare i pozzetti per 4 volte con la soluzione di lavaggio (PBS), riempiendoli completamente. Capovolgere i micropozzetti tra un lavaggio e l'altro per eliminare il liquido. Con un movimento a scatto del polso, scuotere i pozzetti provocando la fuoriuscita del liquido. Asciugare il liquido residuo battendo e/o picchiando le piastre su carta assorbente. Evitare che i pozzetti si asciughino tra le varie fasi.
7. Aggiungere 100 µL di soluzione HAPB coniugata a HRP (soluzione rossa) a tutti i pozzetti.
8. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
9. Al termine dell'incubazione, capovolgere con cautela i micropozzetti e svuotare la soluzione coniugata. Lavare 4 volte con la soluzione PBS e battere o picchiare come descritto alla Fase 6. Evitare che i pozzetti si asciughino.

10. Aggiungere 100 μL di soluzione di substrato monocomponente a ciascun pozzetto e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. Aggiungere la soluzione di substrato nei pozzetti a velocità costante. Nei pozzetti con campioni positivi si sviluppa una colorazione blu.
11. Aggiungere 100 μL di soluzione di arresto (acido solforico 0,36 N) a ciascun pozzetto per arrestare la reazione enzimatica. Assicurarsi di aggiungere la soluzione di arresto ai pozzetti nello stesso ordine e alla stessa velocità usati per la soluzione di substrato.
12. Annullare o azzerare il lettore di piastre contro l'aria. Leggere la densità ottica di ciascun pozzetto a 450 nm (riferimento a 650 nm). La densità ottica dei pozzetti deve essere misurata entro 30 minuti dall'aggiunta della soluzione di arresto.

Risultati

1. Calcolare i valori della densità ottica media per i pozzetti duplicati delle soluzioni di riferimento HA, dei controlli HA, dei bianchi reagenti e dei campioni del paziente.
2. Usando la regressione polinomiale di terzo ordine (consigliata), la curva a 4 parametri o un tracciato manuale (da punto a punto), calcolare la curva più pertinente usando i valori medi di densità ottica dei calibratori da 0 ng/ml (bianco reagente), 50, 100, 200, 500 e 800 ng/ml. Per ciascun turno di dosaggio occorre tracciare una nuova curva. Da questa curva a sei punti, calcolare le concentrazioni risultanti di HA (ng/ml) nei controlli HA e nei campioni del paziente.

Esempio di curva di riferimento
ESCLUSIVAMENTE A SCOPO ESEMPLIFICATIVO, NON USARE



3. I campioni con concentrazioni di HA inferiori a 20 ng/ml possono essere classificati come "inferiori a 20 ng/ml". I campioni con concentrazioni di HA superiori a 800 ng/ml possono essere classificati come "superiori a 800 ng/ml" o possono essere diluiti fino a 1:15 ridosati per ottenere risultati più accurati. I risultati ottenuti con il secondo dosaggio di questi campioni devono essere moltiplicati per il fattore di diluizione per ottenere la concentrazione finale di HA.
4. Assicurarsi che tutti i parametri di controllo di qualità siano stati osservati (vedere la sezione Controllo di qualità) prima di refertare i risultati delle analisi.

Controllo di qualità

1. Il valore medio di densità ottica del bianco reagente deve essere $\leq 0,150$. Valori superiori a 0,150 possono indicare una eventuale contaminazione del substrato monocomponente o di altri reagenti.
2. Il valore medio di densità ottica del calibratore HA da 500 ng/ml deve essere di 0,8 o superiore.
3. Tra i valori di densità ottica doppi non vi devono essere variazioni superiori al 20% per campioni con un valore medio di densità ottica superiore a 0,3.
4. I valori ottenuti per i controlli HA devono rientrare nei range stampati sull'etichetta di ciascun contenitore. Le variabili di analisi in ciascun laboratorio, incluse le apparecchiature e le tecniche utilizzate, possono influire sul recupero del controllo; ciascun laboratorio dovrà stabilire il proprio range accettabile per i controlli HA.
5. Ciascun laboratorio dovrebbe confermare periodicamente i normali valori di cut-off e di prevalenza per la popolazione di pazienti analizzati. Vedere Caratteristiche prestazionali.

CARATTERISTICHE PRESTAZIONALI

Valori attesi²⁴

I livelli di HA sono stati misurati in una popolazione composta da 199 adulti sani con tre lotti di kit per il dosaggio dell'HA in conformità agli standard CLSI C28-A3c. È stato determinato che il valore HA medio di questa popolazione è pari a 17,3 ng/ml con una deviazione standard di 12,8 ng/ml. Usando una tecnica non parametrica, sono stati eliminati i quattro valori più alti e più bassi. **La media normale risultante ≤ 56 ng/ml** include il 95% dei campioni rimanenti.

I dati suggeriscono che per i pazienti con livelli di HA compresi tra 56-150 ng/ml (vedere i dati delle prestazioni cliniche di seguito) potrebbe essere indicato un ulteriore monitoraggio. Il cut-point per la decisione clinica³⁰ è 150 ng/ml, il quale indica la possibilità di fibrosi avanzata. Negli individui affetti da fibrosi avanzata può essere indicato eseguire la biopsia epatica.³⁰

Prestazioni cliniche²⁴ Epatopatia steatosica non alcolica (NASH)

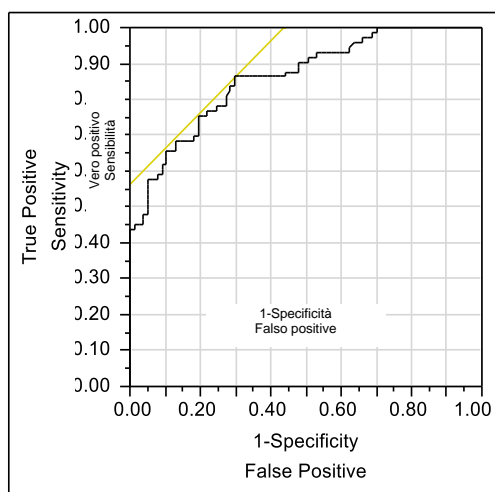
Campioni di siero provenienti da pazienti affetti da NASH sono stati ottenuti dall'Istituto Nazionale della Salute (National Institute of Health, NIH) - divisione NIDDK, i due set separati: set di training, n = 340 e set di convalida, n = 300. Durante lo studio di training sono state valutate le prestazioni cliniche del dosaggio di HA in relazione alla fibrosi epatica ed è stato stabilito un cut-point adeguato per il rilevamento della fibrosi avanzata nella coorte NASH. I dati sono stati quindi convalidati al cut-point selezionato. Le percentuali dei valori predittivi positivi (PPV) e negativi (NPV) sono state calcolate usando il metodo della curva ROC (Receiver Operating Characteristic) paragonando i valori di HA (ng/ml) alla presenza di fibrosi epatica avanzata (METAVIR F3-F4), valutata tramite esame istologico dei campioni biopsici epatici. **Il cut-point per la decisione clinica³⁰ è 150 ng/ml.** Il dosaggio di HA ha mostrato una percentuale dei valori PPV dell'88,0% e dei valori NPV dell'81,4% per l'identificazione di pazienti affetti da fibrosi avanzata al cut-point.

La tabella di seguito indica le caratteristiche del kit per il dosaggio dell'HA a 150 ng/ml:

	Set di convalida
Valori predittivi positivi	88,0%
Valori predittivi negativi	81,4%

Il grafico di seguito mostra il ROC (area sotto la curva) per valutare la fibrosi avanzata (F3 e F4) nei pazienti affetti da NASH:

Set di convalida:



Area sotto la curva = 0,86070

L'area sotto la curva per il set di convalida è di 0,86070, a supporto delle prestazioni cliniche del dosaggio di HA per la valutazione della fibrosi avanzata in pazienti affetti da NASH.

Prestazioni analitiche²⁴

Precisione:

La precisione è stata valutata in conformità a quanto specificato negli standard CLSI EP5-A2 utilizzando campioni di siero alto, medio e basso.

	Basso	Moderato	Elevato
Valore effettivo (ng/ml)	53,5	147,1	721,7
Ripetibilità stimata (%CV)	13,5%	9,3%	8,1%
Stima della precisione in laboratorio (%CV)	16,2%	13,0%	14,5%
Precisione intergiornaliera (%CV)	NC	5%	7%
Fra le serie, Giornaliera (%CV)	11%	8%	10%

NC: NON CALCOLABILE o <0

Riproducibilità:

I dati di riproducibilità sono stati calcolati in conformità a CLSI EP5-A2 e ISO PDTR 22971 (Practical Guide to ISO 5725-2: 1994, TC 69/SC 6.)

Il riassunto dei dati raccolti da tutti i centri di analisi è riportato di seguito:

	Basso	Moderato	Basso positivo	Moderato positivo
Valore effettivo (ng/ml)	32,3	122,0	372,4	613,1
Stima della ripetibilità (%CV)	7,7%	5,9%	8,6%	6,9%
Limite di ripetibilità	7,0	20,2	90,1	117,8
Stima tra laboratori (%CV)	3,2%	3,2%	4,9%	3,6%
Stima di riproducibilità (%CV)	8,3%	5,0%	7,1%	5,8%
Limite di riproducibilità	7,5	17,1	73,9	100,2

Linearità

La linearità del kit per il dosaggio dell'acido ialuronico è stata valutata in conformità a CLSI EP6-A ed è stata dimostrata essere lineare da 20 ng/ml a 1300 ng/ml entro $\pm 10\%$ all'interno di questo intervallo.

Limite di bianco (LoB) / Limite di rilevabilità (LoD):

Sulla base di 360 determinazioni (180 in bianco e 180 positive) usando CLSI EP17-A, il LoD per il kit per il dosaggio dell'HA è di 11 ng/ml con il 95% di probabilità di ottenere una risposta positiva (un risultato superiore al LoB) a questi livelli e il 95% di probabilità di ottenere una risposta negativa su campioni in bianco. È stato usato un LoB di 7 ng/ml.

INTERFERENZA E REATTIVITÀ CROCIATA²⁴

Il kit per il dosaggio dell'HA è stato valutato per interferenze in conformità a CLSI EP7-A2. I seguenti costituenti del siero/plasma, quando aggiunti al siero con livelli di HA bassi, moderati, elevati. Non è stata riscontrata alcuna interferenza ai livelli indicati di seguito:

Emoglobina	200 mg/ml	20.000 mg/dl	N/D
Bilirubina coniugata	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/l
Bilirubina libera	0,5 mg/ml	50 mg/dl	855 mmol/l
Trigliceridi	50 mg/ml	5000 mg/dl	56,5 mmol/l

È stata valutata la reattività crociata tra l'HA e il fattore reumatoide IgM. Il fattore reumatoide IgM, quando aggiunto al siero con livelli di HA bassi, il moderati o elevati in conformità a NCCLS EP7-A2, ha mostrato una reattività crociata pari a <2% a tutti i livelli con il fattore reumatoide IgM.

È stata valutata la reattività crociata tra l'HA e una miscela di composti glicosaminoglicani (condroitin-6-solfato, condroitin-4-solfato, condroitin-2, solfato-6 e condroitin-4-6-solfato). Quando questa miscela è stata aggiunta al siero con livelli di HA bassi, moderati e elevati in conformità a NCCLS EP7-A2, è stata rilevata una reattività crociata pari a <2% a tutti i livelli con i composti glicosaminoglicani.

LIMITI DEL TEST

È possibile usare i livelli di acido ialuronico ottenuti con questo dosaggio per valutare il grado di fibrosi avanzata nei pazienti affetti da malattia cronica del fegato. Il medico deve interpretare questi risultati tenendo conto dell'anamnesi del paziente, degli esami clinici e di altre procedure diagnostiche.

I livelli di HA nel siero possono essere elevati durante l'infiammazione sinoviale e la distruzione della cartilagine come osservato nell'artrite reumatoide, in conseguenza di una maggiore produzione e a causa del passaggio nella circolazione. Elevati livelli di HA nel siero sono stati rilevati anche in alcuni pazienti affetti da osteoartrite attiva o più avanzata, sclerosi sistemi progressiva e lupus eritematoso sistemico; si ritiene che ciò sia dovuto all'attività del fattore di crescita nelle cellule di tessuto connettivo e all'interessamento sinoviale.²⁶⁻²⁸

Come riportato in letteratura,²⁶ i nostri studi mostrano che l'età tende a far aumentare i livelli di HA nei soggetti sani, sebbene in misura minima. È stato dimostrato che il livello di aumento nei soggetti sani è di circa 0,36 ng/ml all'anno.

Garanzia















Si garantisce che le prestazioni di questo prodotto corrispondano a quanto descritto nel presente foglietto illustrativo. La Corgenix, Inc. non rilascia alcuna garanzia implicita di commerciabilità o idoneità a uno scopo particolare, e in nessuna circostanza la Corgenix, Inc. si riterrà responsabile di eventuali danni indiretti.

Per il servizio di assistenza tecnica o di assistenza clienti negli Stati Uniti chiamare il numero 1-800-729-5661. Fuori dagli Stati Uniti, chiamare il numero +1-303-457-4345, inviare un fax al numero +1-303-457-4519, inviare un'e-mail all'indirizzo: technicalsupport@corgenix.com, oppure rivolgersi ad un distributore Corgenix autorizzato.

REFERENCES

1. Sundblad L. The chemistry and biology of compounds containing aminosugars. In *The Amino Sugars*. EA Balazs and REW Jeanloz Editors, Academic Press, N.Y. (1965).
2. Laurent TC. Structure of hyaluronic acid. In *Chemistry and Molecular Biology of the Intracellular Matrix*. EA Balazs Editor, Academic Press, N.Y. (1970).
3. Fraser JRE, Laurent TC, Pertoft H, et al. Plasma clearance, tissue distribution and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem J* 200:415- 424 (1981).
4. Fraser JRE, Laurent TC, Engstrom-Laurent A, et al. Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 11:17-25 (1984).
5. Balazs EA, Watson D, Duff IF, et al. Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. *Arthritis Rheum* 10:357-376 (1967).
6. Engstrom-Laurent A, Hallgren R. Circulating hyaluronate in rheumatoid arthritis: relationship to inflammatory activity and the effect of corticosteroid therapy. *Ann Rheum Dis* 44:83-88 (1985).
7. Tamaki S, Ueno T, et al. Evaluation of hyaluronic acid binding ability of hepatic sinusoidal endothelial cells in rats with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 111:1049-1057 (1996).
8. Engstrom-Laurent A, Loof L, Nyberg A, et al. Increased serum levels of hyaluronate in liver disease. *Hepatology* 5:638-642 (1985).
9. Freborug T, Delpech B, Bercoff E, et al. Serum hyaluronate in liver diseases: study by enzymeimmunological assay. *Hepatology* 6:392-395 (1986).
10. Nyberg A, Engstrom-Laurent A, Loof L. Serum hyaluronate in primary biliary cirrhosis: a biochemical marker for progressive liver damage. *Hepatology* 8:142- 146 (1988).
11. Wong VS, Hughes V, Trull A, et al. Serum hyaluronic acid is a useful marker of liver fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. *J Viral Hepatitis* 5:187-192 (1998).
12. McHutchison JG, Blatt LM, Medina MD, et al. Measurement of serum hyaluronic acid in patients with chronic hepatitis C and its relationship to liver histology. *J Gastroenterol Hepatol* 15:945-951 (2000).
13. Bramley PN, Rathbone BJ, Forbes MA, et al. Serum hyaluronate as a marker of hepatic derangement in acute liver damage. *J Hepatology* 13:8-13 (1991).
14. Ueno T, Inuzuka S, Torimura T, et al. Serum hyaluronate reflects hepatic sinusoidal capillarization. *Gastroenterology* 105:475-481 (1993).
15. Plevris JN, Haydon GH, Simpson KJ, et al. Serum hyaluronan – a non-invasive test for diagnosing liver cirrhosis. *Eur J Gastro & Hepatology* 12:1121-1127 (2000).
16. Guéchet J, Serfaty L, et al. Prognostic value of serum hyaluronan in patients with compensated HCV cirrhosis. *J Hepatology* 32:447-452 (2000).
17. Ueno T, Inuzuka S, Sata M, et al. Serum hyaluronate predicts response to interferon alpha therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepato-Gastroenterology* 42:522-527 (1995).
18. Yamada M, Fukuda Y, et al. Serum hyaluronic acid reflects the effect of interferon treatment on hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 11:646-651 (1996).
19. Hashimoto O, Ueno Y, et al. Long-term improvement of hepatic fibrosis in chronic hepatitis C treated with interferon- α . *Hepatology Res.* 10:200-216 (1998).
20. Tran A, Hastier P, Barjoan EM, et al. Non invasive prediction of severe fibrosis in patients with alcoholic liver disease. *Gastroenterol Clin Biol* 24:626-630 (2000).
21. Deaciuc IV, Spitzer JJ. Hepatic sinusoidal endothelial cell in alcoholemia and endotoxemia. *Alcoholism: Clin & Exp. Research* 20:607-614(1996).
22. Chichibu K, Matsuura, T, Shichijo S, et al. Assay of serum hyaluronic acid in clinical application. *Clin Chimica Acta* 181:317-324 (1989).
23. Lindqvist U, Chichibu K, Delpech B, et al. Seven different assays of hyaluronan compared for clinical utility. *Clin Chemistry* 38:127-132 (1992).
24. Data on File (Corgenix, Inc.).
25. Santos ME, Kondo T, Wieczorek A, Collier D, Lopez LR. Clinical utility of serum hyaluronic acid levels in liver disease. *Clinical Chemistry* 41:S71 (1995).
26. Sharif M, George E, Shepstone L, et al. Serum Hyaluronic Acid level as a predictor of disease progression in Osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 38:760-767 (1995).
27. Engstrom-Laurent A, Feltelius N, Hallgren R, et al. Raised serum hyaluronate levels in Scleroderma: an effect of growth factor induced activation of connective tissue cells? *Ann Rheum Dis* 44:614-620 (1985).
28. Santos ME, Kondo T, Wieczorek A, Lopez LR. Increased serum hyaluronic acid levels in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 37:S247; 525 (1994).
29. Engstrom-Laurent A, Hallgren R. Circulating hyaluronic acid levels vary with physical activity in healthy subjects and in rheumatoid arthritis patients: relationship to synovial mass and morning stiffness. *Arthritis Rheum* 1333-1338 (1987).
30. Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanayal AJ. The Diagnosis and Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2005-2023 (2012).

SYMBOL LEGEND

	Manufacturer Hersteller Fabriqué par Fabricado por Prodotta da
	Authorized Representative Bevoll-mächtiger Représentant agréé Representante autorizado Rappresentante autorizzato
	In vitro diagnostic medical device In-vitro-Diagnostikum Dispositif de diagnostic in vitro Dispositivo médico para diagnóstico in vitro Dispositivo medico-diagnostico in vitro
	Batch Code Chargennummer Code de Lot Código de Lote Codice del lotto
	Use by/Expiry Date Verfallsdatum Utiliser jusqu' à/ Date de péremption Usar antes de/ Fecha de caducidad Scade il/ data di scadenza
	Temperature Limitation Temperatur-beschränkungen Limites de température Limitación de temperatura Limite di temperatura
	Warning Waarschuwing Avertissement Advertencia Avvertimento
	Caution Voorzichtigheid Prudence Precaución Cautela
	Biological Risk Biologisches Risiko Risque biologique Riesgo biológico Rischio biologico
	Catalog Number Katalognummer Numéro de catalogue Número de catálogo Numero di catalogo
	European Conformity CE-Konformitäts-kennzeichnung Conformité aux normes européennes Conformidad europea Conformità europea
	Consult Instructions for Use/ Package Insert Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo
	Importer Importeur Importateur Importador Importatore
	Prescription Only per U.S. FDA Verschreibungspflichtig nur gemäß US-amerikanischer FDA Prescription uniquement selon la FDA des États-Unis Solo con receta, conforme a la FDA de EE. UU. Solo prescrizione per la FDA degli Stati Uniti



MT Promedt Consulting GmbH
Ernst-Heckel-Straße 7
66386 St. Ingbert
Germany



Endotell AG
Gewerbstrasse 25,
CH-4123 Allschwil
Switzerland



ORGENTEC Diagnostika GmbH
Carl-Zeiss-Straße 49-51
55129 Mainz
Germany



Corgenix, Inc.
11575 Main Street, Suite 400
Broomfield, Colorado 80020, USA
REAADS® is a registered trademark of Corgenix, Inc.
© 2023, Corgenix, Inc.

