

Finalità d'uso

Hyaluronic acid LT è un metodo *in vitro* per la determinazione quantitativa di acido ialuronico (HA) nel siero e nel plasma.

Riassunto e spiegazione del test

L'acido ialuronico è un glicosaminoglicano non ramificato, una singola catena di polimeri di unità disaccaridiche contenenti N-acetilesosamina ed esoso.¹ L'acido ialuronico è diffuso principalmente nel tessuto connettivo ed è prodotto soprattutto nelle cellule mesenchimali.² L'acido ialuronico ha diverse funzioni, p.es. la lubrificazione delle articolazioni, la prevenzione dell'attacco dei batteri e l'idratazione interna del corpo.

L'acido ialuronico è il migliore marcatore che si pone come segnale precoce di cirrosi epatica. La concentrazione di acido ialuronico nel siero è significativa in presenza di fibrosi e diminuisce con una risposta alla terapia con interferone nei soggetti affetti da infezione cronica da HCV.³⁻⁹

Hyaluronic acid LT è un kit per la determinazione quantitativa di acido ialuronico, basato sul metodo di agglutinazione al lattice che può essere applicato agli analizzatori di chimica clinica generale.

Principio del metodo

Un campione viene mescolato con una proteina che lega l'acido ialuronico (HABP) e l'acido ialuronico nel campione si combina specificamente con HABP. Per realizzare un aggregato insolubile, le particelle di lattice rivestite di anticorpo anti-HABP vengono aggiunte; il lattice si lega a questo complesso. Come risultato, l'aggregato insolubile aumenta la torbidità della soluzione. Il grado di torbidità della soluzione è misurabile otticamente ed è proporzionale alla concentrazione di acido ialuronico nel campione.

Reagenti

Contenuti e condizioni di conservazione

R1:	Reagente HABP	Conservare a 2-10 °C (non congelare)
R2:	Reagente HA Latex	Conservare a 2-10 °C (non congelare)

Componenti

R1:	Proteina ricombinante legante l'acido ialuronico (rHABP)	
Reagente HABP	Albumina di siero bovino	0,1 %
	Sodio Azide	0,09 %
R2:	Lattice sensibilizzato con anticorpo anti-HABP (topo, monoclonale)	
Reagente HA Latex	Acido bórico	0,31 %
	Albumina di siero bovino	0,5 %
	Sodio Azide	0,09 %

Preparazione dei reagenti

R1: Usare il reagente HABP come fornito.

Dopo aver aperto il flacone, conservare ad una temperatura di 2-10 °C e usare entro un mese.

R2: Usare il reagente HA Latex come fornito.

Dopo aver aperto il flacone, conservare ad una temperatura di 2-10 °C e usare entro un mese.

Raccolta e preparazione dei campioni

Usare siero o plasma come campione.

Analizzare i campioni immediatamente dopo la raccolta.

La stabilità di HA nel campione è mostrata qui di seguito. Tutti i risultati provengono da valutazioni interne. La stabilità di HA nel campione dovrebbe essere diversa a causa delle caratteristiche del campione stesso.

Si raccomanda di effettuare la raccolta dei campioni nel rispetto delle disposizioni di legge nazionali e locali. Dato che tutti i campioni sono potenzialmente infetti, vanno trattati nel rispetto delle disposizioni di legge nazionali e locali sulla sicurezza e la gestione di questo tipo di materiali.

Temperatura di conservazione	Stabilità di HA nel campione
-80 °C	Stabile fino a 26 mesi
-30 °C	Stabile fino a 26 mesi
7 °C	Circa 7 % di diminuzione dopo 60 giorni
26 °C	Circa 11 % di diminuzione dopo 14 giorni

Segni di instabilità fisica o chimica

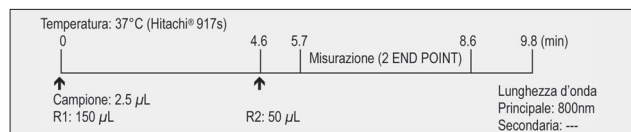
La presenza di precipitati nei reagenti o valori dei controlli fuori dall'intervallo di accettabilità del produttore possono essere segno di instabilità del reagente.

Strumenti

Il reagente è designato per essere usato sulle apparecchiature di analisi disponibili in commercio. Per quanto attiene la descrizione dell'uso e delle specifiche dell'apparecchio far riferimento al manuale operativo. È indispensabile una convalida pratica da parte dell'utilizzatore della procedura nel luogo di utilizzo mediante l'analisi di un numero adeguato di sieri di controllo e di pazienti.

Procedura standard

Temperatura: 37 °C (Hitachi® 737)



Calibratore: Wako HA Calibrator Set (disponibile separatamente)

Applicazione per diversi analizzatori automatici

Inserire i parametri secondo le istruzioni degli strumenti per effettuare la misurazione. Applicazioni strumentali sono disponibili su richiesta.

Calibrazione

La curva di calibrazione viene prodotta automaticamente nell'analizzatore automatico facendo il tracciato dell'assorbimento (torbidità) verso la concentrazione. Usare soluzione fisiologica per il bianco. Consultare il manuale di Istruzione per i dettagli sulla calibrazione. Consultare il produttore dello strumento per maggiori dettagli.

Risultati

I risultati finali vengono calcolati automaticamente e stampati in concentrazione. I risultati sono espressi in ng/mL.

Valori attesi¹⁰

Il valore atteso per l'acido ialuronico è 23 ± 17 ng/mL.

Limitazioni della procedura

- Quando un reattivo non specifico (p.es. anticorpo eterofilo) è presente in un campione, è possibile che non si ottenga un risultato di misura corretto. I risultati dovrebbero essere valutati insieme al giudizio medico e ai sintomi.
- La linearità di Hyaluronic acid LT arriva fino a 1000 ng/mL. Se il valore dell'acido ialuronico supera il limite superiore dell'intervallo misurabile, diluire il campione con soluzione fisiologica, ripetere il test e moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione. Se la concentrazione dell'acido ialuronico nel campione è di 1000-50000 ng/mL, il valore misurato non scende sotto 1000 ng/mL.

Avvertimenti e precauzioni

- Solo per uso diagnostico *in vitro*.
- L'impiego e l'applicazione di questo test è riservato unicamente a professionisti. Rispettare le disposizioni di legge nazionali e locali.
- Non per uso interno in persone od animali.
- Non mescolare i reagenti con numeri di lotto diversi.
- Conservare i reagenti alle condizioni specificate. Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza indicata sul flacone.
- Usare i reagenti sopra descritti solo per lo scopo previsto.
- Usare i reagenti sopra descritti unicamente per la procedura indicata. I risultati non possono essere garantiti se i reagenti sono usati con altre finalità.
- Utilizzare gli strumenti secondo le istruzioni fornite dal manuale d'uso, in condizioni appropriate. Per eventuali dettagli, consultare il produttore dello strumento.
- Non usare il reagente se è stato accidentalmente congelato.
- Si raccomanda di usare i reagenti immediatamente dopo aver aperto i flaconi. Per conservarli, richiudere i flaconi e tenerli alle condizioni specificate.
- Usare i recipienti o altro materiale del kit solo per gli usi qui riportati.
- Prima di usare reagente HA latex, omogeneizzare il reagente capovolgendo lentamente il flacone.
- Il materiale di calibrazione viene venduto separatamente. Per l'utilizzo del materiale di calibrazione, fare riferimento all'inserto della confezione.
- In alcuni casi, un risultato falsamente elevato o basso è dovuto ad una torbidità non specifica. Quando un risultato è improprio, esaminare l'andamento della reazione o diluire il campione e ripetere l'analisi.
- L'assunzione di cibo fa aumentare la concentrazione di acido ialuronico nel siero o nel plasma. Usare come campione siero o plasma prelevato a digiuno.¹¹
- Se i reagenti entrano in contatto con la bocca, gli occhi o la pelle, sciacquare immediatamente con acqua abbondante. Se necessario, ricorrere all'assistenza di un medico.
- Tutti i campioni e gli apparecchi che potrebbero essere contagiati dai campioni vanno trattati con cautela per evitare infezioni.
- Tutti i dispositivi, compresi i reagenti e i flaconi dei reagenti che entrano in contatto con i campioni vanno considerati potenzialmente infettivi.
- I reagenti R1 e R2 contengono lo 0,09 % di sodio azide come stabilizzante. Il sodio azide può reagire con rame o piombo e formare composti esplosivi. Anche se questo prodotto contiene quantità minime di sodio azide. Durante lo smaltimento attraverso i normali scarichi fare scorrere volumi d'acqua abbondanti.
- I reagenti contengono 3090 mg/L di acido bórico (540 mg/L come boron).
- Indossare indumenti protettivi durante l'eliminazione dei liquidi da scaricare, tazzine portacampione e cuvette di misurazione onde evitare infezioni.
- Smaltire i reagenti nel rispetto delle disposizioni di legge nazionali e locali.

Sostanze interferenti

- Acido ascorbico, bilirubina ed emolisi non hanno particolari effetti sulla determinazione.
- Gli anticoagulanti come eparina, citrato, ossalato e EDTA, nonché fluoruro di sodio come inibitore glicolitico, non hanno particolari effetti sulla determinazione se vengono usati in quantità normali.

Caratteristiche delle performance

I dati delle performance sono stati ottenuti utilizzando un Hitachi® 917s).

Linearità

Concentrazioni di acido ialuronico fino a 1000 ng/mL erano lineari nella valutazione effettuata secondo il protocollo EP6-A di CLSI.

Sensibilità

Il limite di rilevazione di questo metodo è 5,8 ng/mL. Il limite è stato determinato in conformità al protocollo EP17-A di CLSI.

Precisione

[Precisione intra-serie]

In basso sono riportati i dati della precisione intra-serie. Il CV di acido ialuronico ottenuto misurando i sieri di controllo 21 volte non era più del 4,3 % di 38,7 ng/mL o a concentrazioni più alte di acido ialuronico.

Campione n.	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Media (ng/mL)	38,7	307,9	914,4
DS (ng/mL)	1,7	2,8	8,1
CV (%)	4,3	0,9	0,9

[Totale precisione]

Qui di seguito sono riportati i valori di tutti i dati di precisione. Tutti i valori sono stati raccolti in conformità al protocollo EP5-A di CLSI.

Campione n.	Campione 1	Campione 2	Campione 3
Totale media (ng/mL)	38,5	308,7	909,2
Totale precisione ST (ng/mL)	2,04	7,39	18,3
Totale precisione CV (%)	5,3	2,4	2,0

Specificità

La specificità è stata studiata aggiungendo nel siero delle sostanze di cui si riteneva che avrebbero influenzato in maniera endogena il risultato del dosaggio dell'acido ialuronico.

Emoglobina	(mg/dL)	Nulla	100	200	300	400	500
Acido ialuronico	(ng/mL)	67,0	66,4	68,8	63,2	66,7	62,8
Resa	(%)	100,0	99,1	102,7	94,3	99,6	93,7

Bilirubina	(mg/dL)	Nulla	10	20	30	40	50
Acido ialuronico	(ng/mL)	68,2	65,9	65,5	64,7	65,0	66,2
Resa	(%)	100,0	96,6	96,0	94,9	95,3	97,1

Bilirubina coniugata	(mg/dL)	Nulla	10	20	30	40	50
Acido ialuronico	(ng/mL)	69,4	64,3	67,2	66,8	67,1	65,8
Resa	(%)	100,0	92,7	96,8	96,3	96,7	94,8

Intrafat	(%)	Nulla	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0
Acido ialuronico	(ng/mL)	68,0	68,4	69,5	69,4	65,5	67,5
Resa	(%)	100,0	100,6	102,2	102,1	96,3	99,3

Acido ascorbico	(mg/dL)	Nulla	10	20	30	40	50
Acido ialuronico	(ng/mL)	62,1	66,2	66,3	63,9	63,2	62,5
Resa	(%)	100,0	106,6	106,8	102,9	101,8	100,6

EDTA-2Na	(mg/dL)	Nulla	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Acido ialuronico	(ng/mL)	65,0	66,2	63,5	65,8	65,6	68,3
Resa	(%)	100,0	101,8	97,7	101,2	100,9	105,1

Citrato di sodio	(mg/dL)	Nulla	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0
Acido ialuronico	(ng/mL)	65,1	61,5	65,5	62,8	65,8	67,4
Resa	(%)	100,0	94,5	100,6	96,5	101,1	103,5

Ossalato di ammonio	(mg/dL)	Nulla	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Acido ialuronico	(ng/mL)	74,6	76,3	76,4	73,9	74,0	77,6
Resa	(%)	100,0	102,3	102,4	99,1	99,2	104,0

Fluoruro di sodio	(mg/dL)	Nulla	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0
Acido ialuronico	(ng/mL)	76,4	75,2	74,7	72,3	74,4	74,3
Resa	(%)	100,0	98,4	97,8	94,6	97,4	97,3

Eparina di sodio	(mg/dL)	Nulla	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10
Acido ialuronico	(ng/mL)	99,4	101,8	101,7	101,9	102,8	103,5
Resa	(%)	100,0	102,4	102,3	102,5	103,4	104,1

Accuratezza

L'accuratezza di questo metodo è stata determinata da uno studio di recupero.

Siero saggio 1

Aggiunto	(ng/mL)	0,00	40,0	100,0	200,0
Misurato	(ng/mL)	36,5	83,7	140,8	235,6
		39,2	80,1	141,3	242,9
		40,2	79,9	142,1	240,9
Media	(ng/mL)	38,6	81,2	141,4	239,8
Ottenuto	(ng/mL)	---	42,6	102,8	201,2
Recupero	(%)	---	106,5	102,8	100,6

Siero saggio 2

Aggiunto	(ng/mL)	0,00	40,0	100,0	200,0
Misurato	(ng/mL)	316,5	354,9	415,8	513,9
		313,2	355,3	419,6	519,4
		308,9	357,1	419,0	510,9
Media	(ng/mL)	312,9	355,8	418,1	514,7
Ottenuto	(ng/mL)	---	42,9	105,2	201,8
Recupero	(%)	---	107,3	105,2	100,9

Siero saggio 3

Aggiunto	(ng/mL)	0,00	40,0	100,0	200,0
Misurato	(ng/mL)	751,6	794,8	868,1	943,3
		757,1	796,6	865,5	972,0
		752,5	789,2	857,0	968,5
Media	(ng/mL)	753,7	793,5	863,5	961,3
Ottenuto	(ng/mL)	---	39,8	109,8	207,6
Recupero	(%)	---	99,5	109,8	103,8

Il recupero di acido ialuronico è del 99,5–109,8 % negli intervalli di concentrazione presentati nella tabella in alto.

Correlazione

Un confronto tra Hyaluronic acid LT ed ELISA (prodotto A di società A) è stato fatto usando un Hitachi® 917s. I risultati del test hanno fornito i seguenti dati:

Saggio	Siero
Coefficiente di correlazione	$r = 0,995$ (n = 133)
Equazione di regressione	$y = 1,004x + 1,917$
x	Prodotto A di società A (ng/mL, siero)
y	Wako Hyaluronic acid LT (ng/mL, siero)
x (ng/mL)	Min = 5, Max = 805, Media = 113
y (ng/mL)	Min = 6, Max = 862, Media = 115

Un confronto tra un campione di siero e di plasma con Hyaluronic acid LT è stato fatto usando un Hitachi® 917s. I risultati del test hanno fornito i seguenti dati:

Coefficiente di correlazione	$r = 0,998$ (n=36)
Equazione di regressione	$y = 1,013x + 0,275$
x	Siero (ng/mL)
y	Plasma (ng/mL)
x (ng/mL)	Min = 7, Max = 221, Media = 63
y (ng/mL)	Min = 10, Max = 219, Media = 64

Controllo della qualità

Per tutti i laboratori clinici si raccomanda un programma di controllo della qualità. L'analisi che usa il Wako's HA Control Set per ogni prova è raccomandata per monitorare la performance della procedura. I valori ottenuti per i controlli dovrebbero avvicinarsi intorno al ± 20 % ai valori assegnati.

Literatur

1. Stryer T, et al.: Biochemistry (Third Edition). 1988; 275 - 277.
2. Laurent T.C., et al.: Ciba foundation Symposium. 1986; 124: 9 - 29.
3. Oberti F., et al.: Gastroenterology. 1997; 113 (5). 1997; 1609 - 1616.
4. Plevris J.N., et al.: Eur J Gastroenterol Hepatol. 2000; 12 (10): 1121 - 1127.
5. Guechot J., et al.: J Hepatol. 1995; 22 (2 Suppl): 103 - 106.
6. Pares A., et al.: Hepatology. 1996; 24 (6): 1399 - 1403.
7. Yamada M., et al.: J Gastroenterol Hepatol. 1996; 11 (7): 646 - 651.
8. Sandra J., et al.: Hepatology. 2004; 40 (4): 1200, 687A.
9. Suzuki A., et al.: Liver Int. 2005; 25 (4): 779 - 786.
10. Frébourg T., et al.: Hepatology. 1986; 6 (3): 392 - 395.
11. Idobe Y., et al.: Intern Med. 1998; 37 (7): 568 - 575.

Informazioni per ordinare

Codice n.	Prodotto	Confezione
992-71185	Hyaluronic acid LT	R1: 2 x 15 mL R2: 2 x 6 mL
993-71095	Hyaluronic acid LT	R1: 2 x 31 mL R2: 2 x 11 mL
993-71115	HA Calibrator Set	CAL: 5 conc. x 2 ml
998-71165	HA Control Set	CONTROL: 2 x 2 conc. x 2 mL