

Utilisation

Hyaluronic acid LT est une méthode de dosage *in vitro* pour la détermination quantitative de l'acide hyaluronique (AH) dans le sérum et le plasma.

Résumé et explication du test

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane non ramifié, une simple chaîne de polymères de motifs disaccharidiques formés de N-acétyl-hexosamine et d'hexose.¹ L'acide hyaluronique est largement présent dans le tissu conjonctif et est produit principalement par les cellules mésenchymateuses.² L'acide hyaluronique a plusieurs fonctions, notamment la lubrification des articulations, la prévention contre les infections bactériennes et l'hydratation des tissus cutanés en profondeur. L'acide hyaluronique est le meilleur marqueur pour évaluer en série la cirrhose du foie. La concentration sérique d'AH augmente parallèlement à l'évolution de la fibrose, elle diminue également en réponse à une thérapie par interféron chez les patients atteints d'une infection hépatique chronique (VHC).^{3,9} Hyaluronic acid LT est un test de détermination quantitative de l'acide hyaluronique basé sur la méthode de l'agglutination au latex. Cette méthode peut être réalisée, en général, sur les analyseurs automatiques.

Principe de la méthode

Un échantillon est mélangé à la protéine liante de l'acide hyaluronique (HABP), et l'acide hyaluronique de l'échantillon se combine au HABP. Afin de constituer un agrégat insoluble, des billes de latex recouvertes d'anticorps HABP sont ajoutées et le latex se combine au mélange. L'agrégat insoluble augmente ainsi la turbidité de la solution. Le degré de turbidité de la solution peut être mesuré optiquement, il est proportionnel à la concentration en acide hyaluronique de l'échantillon.

Réactifs

Contenus et conditions de conservation

R1 :	Réactif HABP	Conservé à 2 - 10 °C (ne pas congeler)
R2 :	Réactif latex AH	Conservé à 2 - 10 °C (ne pas congeler)

Ingrédients

R1 :	Protéine liante de l'acide hyaluronique recombinante (rHABP)	
Réactif HABP	Sérumalbumine Bovine	0,1 %
	Azide de Sodium	0,09 %
R2 :	Latex sensibilisé avec anticorps anti-HABP (souris, monoclonale)	
Réactif latex AH	Acide Borique	0,31 %
	Sérumalbumine Bovine	0,5 %
	Azide de Sodium	0,09 %

Préparation du réactif

- R1 : Utiliser le réactif HABP fourni.
Après ouverture, le conserver entre 2 - 10°C et l'utiliser dans le mois.
- R2 : Utiliser le réactif AH latex fourni.
Après ouverture, le conserver entre 2 - 10°C et l'utiliser dans le mois.

Prélèvement et préparation de l'échantillon

Utiliser du sérum ou du plasma comme échantillon. Analyser les échantillons immédiatement après le prélèvement. La stabilité de l'AH est résumée ci-dessous. Tous les résultats fournis proviennent d'évaluation interne. La stabilité de l'AH dans les échantillons peut être différente selon les caractéristiques de l'échantillon. Les prélèvements doivent être effectués conformément aux lois et règlements locaux et nationaux. Les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés selon les règlements locaux et nationaux en vigueur.

Température de conservation	Stabilité AH dans l'échantillon
-80 °C	Stable jusqu'à 26 mois
-30 °C	Stable jusqu'à 26 mois
7 °C	Diminution d'environ 7 % après 60 jours
26 °C	Diminution d'environ 11 % après 14 jours

Indications physique et chimique concernant l'instabilité

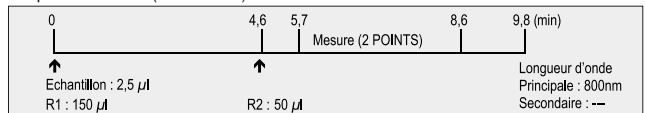
La présence d'un précipité dans les réactifs ou des valeurs de contrôle en dehors de la gamme acceptable fournie par le fabricant peut indiquer une instabilité du réactif.

Instruments

Le réactif doit être utilisé sur les analyseurs automatiques présents sur le marché. Consulter le manuel d'instruction pour la description du mode opératoire et les spécifications de l'appareil. Il est indispensable que l'utilisateur procède à une validation dans son laboratoire en pratiquant un nombre suffisant de mesures sur des échantillons appropriés de sérums de contrôle ou de patients.

Procédure standard

Température : 37 °C (Hitachi® 737)



Calibrateur : Wako HA Calibrator Set (disponible séparément)

Application suivant les analyseurs automatiques

Saisir les paramètres conformément aux indications des appareils utilisés pour la mesure. Applications relatives aux appareils disponibles sur simple demande.

Étalonnage

La courbe d'étalonnage se fait automatiquement dans l'analyseur automatique en mesurant l'absorbance (turbidité) en fonction de la concentration. Employer une solution saline pour une utilisation à vide. Se référer au mode d'emploi pour effectuer l'étalonnage.

Résultats

Les résultats finaux sont calculés et imprimés automatiquement. La concentration est donnée en ng/ml.

Valeurs attendues¹⁰

La valeur attendue pour l'acide hyaluronique est de 23 ± 17 ng/ml.

Limites de la procédure

- (1) Lorsque des réactifs non spécifiques (par exemple un anticorps hétérophile) sont présents dans l'échantillon, il est possible que les résultats ne soient pas corrects. L'analyse devra être corrélée par un avis médical et par les symptômes.
- (2) La linéarité de l'Hyaluronic acid LT va jusqu'à 1000 ng/ml. Si les valeurs en acide hyaluronique dépassent la limite supérieure mesurable, diluer l'échantillon dans une solution saline, répéter l'analyse et multiplier le résultat obtenu par le facteur de dilution. Lorsque la concentration de l'acide hyaluronique de l'échantillon est comprise entre 1000 - 50000 ng/ml, le résultat ne peut être inférieur à 1000 ng/ml.

Avertissements et précautions

- Utiliser uniquement *in vitro*.
- Ce test est réservé à des professionnels habilités à le réaliser selon les lois locales et nationales en vigueur.
- Utilisation externe uniquement (humains et animaux).
- Ne pas mélanger les réactifs de différents lots.
- Conserver les réactifs dans les conditions précisées. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
- N'utiliser les réactifs que pour l'usage prévu sur cette notice.
- Ne pas utiliser les réactifs pour toute autre procédure que celle décrite dans cette notice. Nous ne saurions garantir la fiabilité des résultats en cas d'utilisation d'une procédure différente.
- Se servir des appareils conformément au mode d'emploi et dans les conditions correctes. Se référer au manuel du constructeur pour les détails.
- Ne pas utiliser de réactifs qui auraient été congelés par erreur.
- Utiliser de préférence les réactifs immédiatement après ouverture. Si vous stockez des réactifs ouverts, bien fermer les flacons et les conserver les dans les mêmes conditions que celles décrites pour les réactifs neufs.
- Ne pas utiliser les emballages ou tout autre partie du coffret pour autre chose que ce que cette notice décrit.
- Avant d'utiliser le réactif latex AH, homogénéiser le réactif en retournant lentement le flacon.
- Le matériel d'étalonnage est vendu séparément. Pour l'utiliser lire la notice du coffret.
- En cas de résultats trop élevés ou trop bas, vérifier la turbidité. Si les résultats vous paraissent douteux, vérifier la réaction ou diluer l'échantillon et répéter l'analyse.
- La prise de nourriture a pour conséquence une élévation de la concentration en acide hyaluronique dans le sang ou le plasma. Faire les prélèvements à jeun.
- En cas de contact avec la bouche, la peau, ou les yeux, rincer immédiatement à grande eau. Contacter un médecin ou votre centre antipoison.
- L'ensemble du matériel en contact avec les échantillons doit être traité avec attention afin d'éviter d'éventuelles infections.
- Tout objet, y compris les réactifs et les flacons de réactifs, qui entre en contact avec le prélèvement doit être considéré comme potentiellement infectieux.
- Les réactifs R1 et R2 contiennent 0,09% d'azide de sodium comme stabilisateur. L'azide de sodium peut réagir au contact du cuivre ou du plomb et former des composés explosifs. Malgré la faible quantité d'azide de sodium contenue, il convient de rincer les évacuations d'eau lorsqu'on y vide le produit.
- Les réactifs contiennent 3090 mg/l d'acide borique (540 mg/l sous forme de bore).
- Porter des vêtements de protection lorsque vous jetez les eaux usées, la cuve échantillon et le disque de mesure afin d'éviter tous risques infectieux.
- Eliminer les réactifs conformément aux lois locales et nationales en vigueur.

Étiquetage selon le règlement (CE) n° 1272/2008

- Le produit est classifié et étiqueté selon le règlement CLP.
- Le produit (R2) contient de SVHC sous REACH Article 57 >0,1% : acide borique

Composants dangereux déterminants pour l'étiquetage (R1)

- thiocyanate de sodium

Pictogrammes de danger



Attention

Mentions de danger

- Provoque une sévère irritation des yeux.

992-71185
0724D3

Conseils de prudence

- Se laver soigneusement après manipulation.
- Porter un équipement de protection des yeux / un équipement de protection du visage.
- EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.

Substances interférentes

- a) L'acide ascorbique, la bilirubine et l'hémolyse n'ont pas d'influence significative sur les analyses.
- b) Les anticoagulants de type héparine, citrate, oxalate et EDTA, et le fluorure de sodium utilisés comme inhibiteur glycolytique, en quantité habituelle, n'ont pas d'influence significative sur les analyses.

Performances

Ces données ont été obtenues en utilisant un Hitachi® 917s.

Linéarité

Les concentrations en acide hyaluronique jusqu'à 1000 ng/ml étaient linéaires dans l'évaluation réalisée suivant le protocole CLSI EP6-A.

Sensibilité

La limite de détection de cette méthode est de 5,8 ng/ml. Cette limite a été fixée suivant le protocole CLSI EP17-A.

Précision

[Précision intra-série]

Données représentatives de la précision intra-série. Le CV de l'acide hyaluronique obtenu en mesurant du sérum de contrôle 21 fois n'a jamais dépassé 4,3 % à 38,7 ng/ml ou plus en concentration d'AH.

Référence échantillon	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Moyenne (ng/ml)	38,7	307,9	914,4
Ecart type (ng/ml)	1,7	2,8	8,1
CV (%)	4,3	0,9	0,9

[Précision totale]

Ci-dessous les données relatives à la précision totale. Toutes ces données ont été collectées selon le protocole CLSI EP5-A.

Echantillon No.	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Moyenne totale (ng/ml)	38,5	308,7	909,2
Précision totale ST (ng/ml)	2,04	7,39	18,3
Précision totale CV (%)	5,3	2,4	2,0

Spécificité

La spécificité a été étudiée après ajout de substances dans le sérum qui auraient pu interférer de façon endogène sur le résultat des dosages d'acide hyaluronique.

Hémoglobine (mg/dl)	Aucun	100	200	300	400	500	
AH (ng/ml)		67,0	66,4	68,8	63,2	66,7	62,8
Rendement (%)		100,0	99,1	102,7	94,3	99,6	93,7
Bilirubine (mg/dl)	Aucun	10	20	30	40	50	
AH (ng/ml)		68,2	65,9	65,5	64,7	65,0	66,2
Rendement (%)		100,0	96,6	96,0	94,9	95,3	97,1
Bilirubine conjuguée (mg/dl)	None	10	20	30	40	50	
AH (ng/ml)		69,4	64,3	67,2	66,8	67,1	65,8
Rendement (%)		100,0	92,7	96,8	96,3	96,7	94,8
Injection souscutanée (%)	Aucun	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	
AH (ng/ml)		68,0	68,4	69,5	69,4	65,5	67,5
Rendement (%)		100,0	100,6	102,2	102,1	96,3	99,3
Acide ascorbique (mg/dl)	Aucun	10	20	30	40	50	
AH (ng/ml)		62,1	66,2	66,3	63,9	63,2	62,5
Rendement (%)		100,0	106,6	106,8	102,9	101,8	100,6
EDTA-2Na (%)	Aucun	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	
AH (ng/ml)		65,0	66,2	63,5	65,8	65,6	68,3
Rendement (%)		100,0	101,8	97,7	101,2	100,9	105,1
Citrate de sodium (%)	Aucun	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	
AH (ng/ml)		65,1	61,5	65,5	62,8	65,8	67,4
Rendement (%)		100,0	94,5	100,6	96,5	101,1	103,5
Oxalate d'ammonium (%)	Aucun	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	
AH (ng/ml)		74,6	76,3	76,4	73,9	74,0	77,6
Rendement (%)		100,0	102,3	102,4	99,1	99,2	104,0
Fluorure de sodium (%)	Aucun	0,6	1,2	1,8	2,4	3,0	
AH (ng/ml)		76,4	75,2	74,7	72,3	74,4	74,3
Rendement (%)		100,0	98,4	97,8	94,6	97,4	97,3
Sodium hépariné (%)	Aucun	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	
AH (ng/ml)		99,4	101,8	101,7	101,9	102,8	103,5
Rendement (%)		100,0	102,4	102,3	102,5	103,4	104,1

Exactitude

L'exactitude de cette méthode a été déterminée par un test de surcharge.

Spécimen de sérum 1				
Ajouté (ng/ml)	0,00	40,0	100,0	200,0
Mesuré	36,5	83,7	140,8	235,6
	39,2	80,1	141,3	242,9
	40,2	79,9	142,1	240,9
Moyenne (ng/ml)	38,6	81,2	141,4	239,8
Obtenu (ng/ml)	---	42,6	102,8	201,2
Surcharge (%)	---	106,5	102,8	100,6

Spécimen de sérum 2				
Ajouté (ng/ml)	0,00	40,0	100,0	200,0
Mesuré	316,5	354,9	415,8	513,9
	313,2	355,3	419,6	519,4
	308,9	357,1	419,0	510,9
Moyenne (ng/ml)	312,9	355,8	418,1	514,7
Obtenu (ng/ml)	---	42,9	105,2	201,8
Surcharge (%)	---	107,3	105,2	100,9

Spécimen de sérum 3				
Ajouté (ng/ml)	0,00	40,0	100,0	200,0
Mesuré	751,6	794,8	868,1	943,3
	757,1	796,6	865,5	972,0
	752,5	789,2	857,0	968,5
Moyenne (ng/ml)	753,7	793,5	863,5	961,3
Obtenu (ng/ml)	---	39,8	109,8	207,6
Surcharge (%)	---	99,5	109,8	103,8

La surcharge en acide hyaluronique varie entre 99,5 % et 109,8 % dans les gammes de concentrations indiquées sur ce tableau.

Corrélation

Une comparaison entre l'acide hyaluronique LT et ELISA (produit de la société A) a été menée en utilisant Hitachi® 917s. Les résultats des tests sont les suivants :

Spécimen	Sérum
Coefficient de corrélation	r = 0,995 (n = 133)
Equation de régression	y = 1,004x + 1,917
x	Produit de la société A (ng/ml, sérum)
y	Wako Hyaluronic acid LT (ng/ml, sérum)
x (ng/ml)	Min = 5, Max = 805, Moyenne = 113
y (ng/ml)	Min = 6, Max = 862, Moyenne = 115

Une comparaison entre des échantillons de sérum et de plasma a été menée en utilisant Hitachi® 917s. Les résultats de ces tests :

Coefficient de corrélation	r = 0,998 (n = 36)
Equation de régression	y = 1,013x + 0,275
x	Sérum (ng/ml)
y	Plasma (ng/ml)
x (ng/ml)	Min = 7, Max = 221, Moyenne = 63
y (ng/ml)	Min = 10, Max = 219, Moyenne = 64

Contrôle de qualité

Chaque laboratoire doit avoir un programme de contrôle de qualité. Nous vous recommandons d'utiliser pour ce faire le coffret Wako HA Calibrator Set pour chaque analyse afin de surveiller la performance de cette procédure. Les valeurs obtenues lors de ces contrôles doivent rester à ± 20% des valeurs communiquées.

Références

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

Informations de commande

Réf. catalogue	Produit	Conditionnement
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

Fabricant :

FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
Fuggerstr. 12 · 41468 Neuss · Germany
Telephone : +49 2131 311 272 · Fax : +49 2131 311 100
diagnostics_wkeu@fujifilm.com · www.wako-chemicals.de

Wako