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.

ZUSAMMENFASSENDE ERLÄUTERUNG

Hyaloronsäure (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 Alkoholzirrhose[20] 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).

   Reizend

PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Die bevorzugten Probenmatrizes sind Serum oder Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA). 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 ± 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

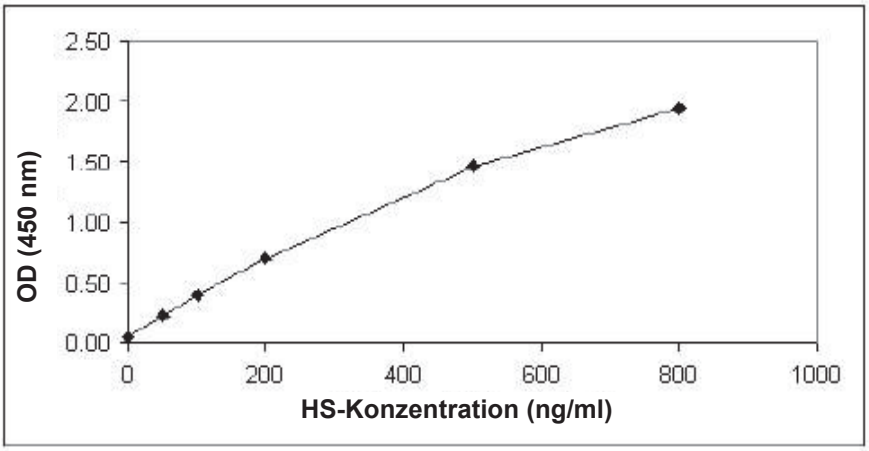
1. Die Analyse der HS-Standards, der HS-Kontrollen sowie der Leerproben sollte jeweils doppelt durchgeführt werden. Für die Patientenproben werden ebenfalls Doppelbestimmungen empfohlen. Als Leerprobe wird Reaktionspuffer ohne Serum verwendet, der einer Standardlösung mit 0 ng/ml HS entspricht. Bei den 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 Waschschritten nicht austrocknen.
7. 100 µl Lösung mit HRP-konjugiertem HABP (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 Analysenergebnisse erstellt wird, muss sichergestellt sein, dass alle Qualitätskontrollparameter erfüllt sind (siehe Qualitätskontrolle).

Qualitätskontrolle

1. Die mittlere optische Dichte der Leerprobe sollte ≤ 0,1 sein. Ein höherer Messwert als 0,1 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 Werte[24]

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 Leistungsmerkmale[24] *Nichtalkoholische Steatohepatitis (NASH)*

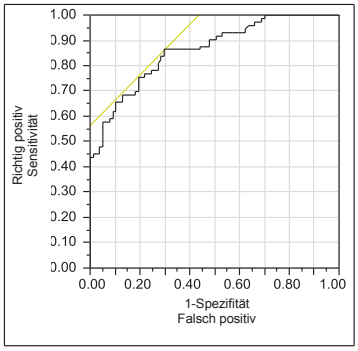
Von der Abteilung NIDDK des National Institute of Health (NIH) der USA wurden zwei separate Sätze von Serumproben von NASH-Patienten bezogen: ein Satz mit 340 Proben zur Etablierung und ein Satz mit 300 Proben zur Validierung des Assays. Bei der Studie zur Etablierung des Assays wurden die klinischen 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 Entscheidungsfindung[30] 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 Leistungsmerkmale[24]

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-Päzision (% 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-Päzision (% 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 ± 10 % betrugen.

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 KREUZREAKTIVITÄT[24]

Der HS-Testkit wurde gemäß CLSI-Richtlinie EP7-A2 im Hinblick auf Interferenzen beurteilt. Die folgenden Serum- bzw. Plasmabestandteile 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 Osteoarthrose (OA), progressiver systemischer Sklerose (PSS) sowie systemischem Lupus erythematodes (SLE) beobachtet; es wird angenommen, dass sie auf die Wachstumsfaktoraktivität in den Bindegewebszellen sowie die Synovialbeteiligung zurückzuführen sind.[26-28]

In der Literatur[26] 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.

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 enzymoimmunological 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. Guéchot 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 hyaulronate 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- a. *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; 5ƒƒ (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 Gastoenterology, and the American Gastroenterological Association. *Hepatology* 2005-2023 (2012).

SYMBOL LEGEND

	EC REP	IVD	LOT			Xi	REF	CE	
Manufacturer	Authorized Representative	In vitro diagnostic medical device	Batch Code	Use by/ Expiry Date	Temperature Limitation	Irritant	Catalog Number	European Conformity	Consult Instructions for Use/ Package Insert
Hersteller	Bevoll-mächtigter	In-vitro-Diagnostikum	Chargennummer	Verfallsdatum	Temperatur-beschränkungen	Reizend	Katalognummer	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Gebrauchsanweisung im Inneren der Verpackung beachten
Fabriqué par	Représentant agréé	Dispositif de diagnostic in vitro	Code de Lot	Utiliser jusqu' à/ Date de péremption	Limites de température	Irritant	Numéro de catalogue	Conformité aux normes européennes	Consulter le mode d'emploi/ notice jointe au conditionnement
Fabricado por	Representante autorizado	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro	Código de Lote	Usar antes de/ Fecha de caducidad	Limitación de temperatura	Irritante	Número de catálogo	Conformidad europea	Consultar las instrucciones de uso/ prospecto del envase
Prodotta da	Rappresentante autorizzato	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Codice del lotto	Scade il/ data di scadenza	Limite di temperatura	Irritante	Numero di catalogo	Conformità europea	Consultare le istruzioni per l'uso/ il foglietto illustrativo

CE

Corgenix, Inc.
Broomfield, Colorado 80020, USA
© 2014, Corgenix, Inc.

US Patent Number 5,019,498
Japanese Patent Number (JP) 2073041
European Patent Number (EP) 283779

EC REP
MT Promedt Consulting GmbH
Altenhofstrasse 80
D-66386 St. Ingbert/Germany

10734 08
Effective: 2014-09-05