

Quantitative determination of Haptoglobin (HAPTO) IVD

Store 2 - 8°C.

INTENDED USE

HAPTO is a quantitative turbidimetric test for the measurement of haptoglobin in human serum or plasma.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Anti-haptoglobin antibodies when mixed with samples containing haptoglobin, form insoluble complexes. These complexes cause an absorbance change, dependent upon the haptoglobin concentration of the patient sample, that can be quantified by comparison from a calibrator of known haptoglobin concentration.

CLINICAL SIGNIFICANCE

The haptoglobin is an α_2 -glycoprotein synthesized in the liver that binds hemoglobin irreversibly. The hapto-hemoglobin complexes, as well as free haptoglobin itself, play significant roles in the iron storage and prevents of possible renal damage as a consequence of hemoglobin excretion. As an acute-phase protein, haptoglobin is increased in the presence of acute inflammatory process, tissue necrosis or malignancy.

Haptoglobin deficiency in plasma is a consequence of hemolysis "in vivo", presence of estrogens in pregnancy and oral contraceptive therapy, as well as most forms of acute or chronic hepatocellular disease, including viral hepatitis.

Hepatoglobulin test is mainly used for the determination and monitoring the hemolytic disorders. Under normal circumstances, approximately 1% of circulating red blood cells are destroyed every day. If this increases to 2%, it will completely deplete plasma haptoglobin in the absence of production stimulus such as acute inflammation or corticosteroids therapy.

REAGENTS

Diluent (R1)	Tris buffer 20 mmol/L, PEG 8000, pH 8.3. Sodium azide 0.95 g/L.
Antiserum (R2)	Goat serum, anti-human haptoglobin pH 7.5. Sodium azide 0.95 g/L.
Optional	Ref: 1102003 PROT CAL.

CALIBRATION

The assay has been standardized against the Reference Material CRM 470/RPPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). It must be used the PROT CAL Calibrator to calibrate the reagent. The reagent (both monoreagent and bireagent) should be recalibrated every month, when the controls are out of specifications, and when changing the reagent lot or the instrument settings.

PREPARATION

Reagents: Ready to use.

Calibration Curve: Prepare the following PROT CAL Calibrator dilutions in C1Na 9 g/L as diluent. Multiply the concentration of the haptoglobin calibrator by the corresponding factor stated in table below to obtain the haptoglobin concentration of each dilution.

Calibrator dilution	1	2	3	4	5	6
Calibrator (μ L)	--	10	25	50	75	100
NaCl 9 g/L (μ L)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1.0

STORAGE AND STABILITY

All the components of the kit are stable until the expiration date on the label when stored tightly closed at 2-8°C and contaminations are prevented during their use. Do not use reagents over the expiration date.

Reagent deterioration: The presence of particles and turbidity.

Do not freeze; frozen Antibody or Diluent could change the functionality of the test.

ADDITIONAL EQUIPMENT

- Thermostatic bath at 37°C.
- Spectrophotometer or photometer thermostatable at 37°C with a 340 nm filter (320 - 360 nm).

SAMPLES

Fresh serum or plasma. EDTA or heparin should be used as anticoagulant. Stable 7 days at 2-8°C or 3 months at -20°C.

The samples with presence of fibrin should be centrifuged before testing. Do not use highly hemolyzed or lipemic samples.

PROCEDURE

1. Bring the reagents and the photometer (cuvette holder) to 37°C.
2. Assay conditions:

Wavelength : 340 nm
Temperature : 37 °C
Cuvette ligh path : 1cm

3. Adjust the instrument to zero with distilled water.

4. Pipette into a cuvette:

Reagent R1 (μ L)	800
Sample or Calibrator (μ L)	10

5. Mix and read the absorbance (A_1) after the sample addition.

6. Immediately, pipette into de cuvette:

Reagent R2 (μ L)	200
-----------------------	-----

7. Mix and read the absorbance (A_2) of calibrators and sample exactly 2 minutes after the R2 addition.

Spinreact has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

CALCULATIONS

Calculate the absorbance difference ($A_2 - A_1$) of each point of the calibration curve and plot the values obtained against the haptoglobin concentration of each calibrator dilution. Haptoglobin concentration in the sample is calculated by interpolation of its ($A_2 - A_1$) in the calibration curve.

QUALITY CONTROL

Control sera are recommended to monitor the performance of manual and automated assay procedures. Spinreact PROT CONTROL (Ref.:1102004) is available. Each laboratory should establish its own Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

REFERENCE VALUES²

Between 30 - 200 mg/dL. Each laboratory should establish its own reference range.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

1. **Measurement range:** Up to 300 mg/dL under the described assay conditions. Samples with higher concentrations, should be diluted 1/5 in NaCl 9 g/L and retested again. The linearity limit depends on the sample / reagent ratio. It will be higher by decreasing the sample volume, although the sensitivity of the test will be proportionally decreased.
2. **Detection Limit:** Values less than 1.3 mg/dL give non-reproducible results.
3. **Prozone effect:** No prozone effect was detected upon 1200 mg/dL.
4. **Sensitivity:** Δ 4.96 mA / mg/dL (100 mg/dL).
5. **Precision:** The reagent has been tested for 20 days, using three levels of serum in a EP5-based study.

EP5	CV (%)		
	39.25 mg/dl	97.35 mg/dl	191.5 mg/dl
Total	8%	3.2%	2.3%
Within Run	1.5%	0.9%	1.2%
Between Run	6.7%	2.3%	1.2%
Between Day	4%	2%	1.5%

6. **Accuracy:** Results obtained using this reagent (y) were compared to those obtained using the method from Beckman (System Array 360 CE). 35 samples ranging from 10 to 400 mg/dL of Haptoglobin were assayed. The correlation coefficient (r) was 0.98 and the regression equation $y = 0.88x + 4.8$.

The results of the performance characteristics depend on the used analyzer.

INTERFERENCES

Hemoglobin (50 g/L), bilirubin (50 mg/dL), rheumatoid factors (950 IU/mL), do not interfere. Lipemia (\geq 6 g/L), interfere. Other substances may interfere^{6,7}.

NOTES

1. Linearity depends on the calibrator concentration.
2. Clinical diagnosis should not be made on findings of a single test result, but should integrate both clinical and laboratory data.

BIBLIOGRAPHY

1. Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
2. Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34:517-520.
3. Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
4. Kluthe R et al. Nature 1965; 205: 93-94.
5. Tarukosky PH et al. Scand J Clin Lab Invest 1966; 18: 80-86.
6. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
7. Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PACKAGING

Ref.: 1102074

Cont.

R1. Diluent: 1 x 40 mL

R2. Antibody: 1 x 10 mL

Determinación cuantitativa de Haptoglobina (HAPTO) IVD

Conservar a 2 - 8°C.

USO RECOMENDADO

HAPTO es un ensayo turbidimétrico para la cuantificación de haptoglobina en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DEL METODO

Los anticuerpos anti-haptoglobina forman compuestos insolubles cuando se combinan con la haptoglobina de la muestra del paciente, ocasionando un cambio de absorbancia proporcional a la concentración de haptoglobina en la muestra, y que puede ser cuantificada por comparación con un calibrador de haptoglobina de concentración conocida.

SIGNIFICADO CLINICO

 La haptoglobina es una α_2 -glicoproteína sintetizada por el hígado, y capaz de unirse a la hemoglobina irreversiblemente. Los complejos hapto-hemoglobina, así como, la haptoglobina libre, juegan un papel importante en la conservación del hierro y la prevención de posibles daños renales producidos por la excreción de hemoglobina. La concentración de haptoglobina, como proteína de fase aguda, se incrementa como consecuencia de procesos inflamatorios, necrosis de tejidos o neoplasias.

La disminución de haptoglobina en el plasma es consecuencia de hemólisis in vivo, la presencia de estrógenos en el embarazo y de la terapia contraceptiva, así como de diversas formas de enfermedad aguda o crónica del hígado incluida la hepatitis viral aguda. El ensayo de haptoglobina se usa principalmente para la determinación y seguimiento de alteraciones hemolíticas. Bajo circunstancias normales, diariamente se destruyen o se eliminan de la circulación el 1% de los hemáticos circulantes. Un incremento de tan solo un 2% de destrucción, reducirá completamente la concentración de haptoglobina en ausencia de estímulos de producción como inflamaciones o terapia de corticoides.

REACTIVOS

Diluyente (R1)	Tampón tris 20 mmol/L, PEG 8000, pH, 8,3. Azida sódica 0,95 g/L.
Anticuerpo (R2)	Suero de cabra, anti-haptoglobina humana, pH 7,5. Azida sódica 0,95 g/L.
Opcional:	Ref: 1102003 PROT CAL.

CALIBRACION

El ensayo está calibrado frente a un Material de Referencia CRM 470/RPPHS (Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM). Debe utilizarse el PROT CAL para la Calibración. El reactivo (tanto monoreactivo como bireactivo) se debe recalibrar cada mes, cuando los controles están fuera de especificaciones, y cuando el lote de reactivo o la configuración del instrumento cambia.

PREPARACIÓN
Reactivos: Listos para el uso.

Curva de Calibración: Preparar las siguientes diluciones del Calibrador PROT CAL en ClNa 9 g/L como diluyente. Para obtener las concentraciones de cada dilución de haptoglobina, multiplicar la concentración de haptoglobina del calibrador por el factor correspondiente indicado en la tabla:

Dilución calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador (μ L)	--	10	25	50	75	100
ClNa 9 g/L (μ L)	100	90	75	50	25	-
Factor	0	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, y se evita la contaminación durante su uso. No utilizar reactivos que hayan sobrepasado la fecha de caducidad.

Indicadores de deterioro: La presencia de partículas y turbidez.

No congelar; la congelación del Anticuerpo o Diluyente puede afectar la funcionalidad de los mismos.

MATERIAL ADICIONAL

- Baño de agua a 37°C.
- Espectrofotómetro o fotómetro con cubeta termostatzable a 37°C para lecturas a 340 nm (320-360 nm).

MUESTRAS

Suero o plasma fresco, recogido con heparina o EDTA como anticoagulantes. Estable 7 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C.

Las muestras con restos de fibrina deben centrifugarse.

No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

PROCEDIMIENTO

1. Calentar los reactivos y el fotómetro (portacubetas) a 37°C.

2. Condiciones del ensayo:

Longitud de onda: 340 nm

Temperatura: 37°C

Paso de luz de la cubeta: 1 cm

3. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.

4. Pipetear en una cubeta:

Reactivo R1 (μ L)	800
Muestra o Calibrador (μ L)	10

 5. Mezclar y leer la absorbancia (A_1) después de la adición de la muestra.

6. Inmediatamente después, pipetear en la cubeta:

Reactivo R2 (μ L)	200
------------------------	-----

 7. Mezclar y leer la absorbancia (A_2) exactamente después de 2 minutos de añadir el reactivo R2.

Spinreact dispone de adaptaciones detalladas a la mayoría de analizadores automáticos del mercado. Solicite la información a su distribuidor.
CALCULOS

 Calcular la diferencia de absorbancias ($A_2 - A_1$) obtenidas para los distintos calibradores, y construir la curva de calibración de los valores obtenidos frente a las concentraciones de haptoglobina de cada dilución del Calibrador. La concentración de haptoglobina en la muestra se calcula por interpolación de su diferencia ($A_2 - A_1$) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda utilizar sueros control para controlar los ensayos tanto en procedimiento manual como en automático. Spinreact dispone del PROT CONTROL Ref: 1102004.

Cada laboratorio debería establecer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias exigidas.

VALORES DE REFERENCIA²

Entre 30 - 200 mg/dL. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

- Rango de medida:** hasta 300 mg/dL en las condiciones descritas del ensayo. Las muestras con valores superiores deben diluirse 1/5 con ClNa 9 g/L y ensayarse de nuevo. El intervalo de medida depende de la relación muestra/reactivo. Disminuyendo el volumen de muestra, se aumenta el límite superior del intervalo de medida, aunque se reduce la sensibilidad.
- Límite de detección:** valores por debajo de 1,3 mg/dL dan lugar a resultados poco reproducibles.
- Sensibilidad:** 4.96 mA / mg/dL (100 mg/dL).
- Efecto prozona:** No se observa hasta valores de 1200 mg/dL.
- Precisión:** El reactivo ha sido probado durante 20 días con tres niveles diferentes de suero en un estudio basado en las normas EP5 (NCCLS).

EP5	CV (%)		
	39.25 mg/dl	97.35 mg/dl	191.5 mg/dl
Total	8%	3.2%	2.3%
Within Run	1.5%	0.9%	1.2%
Between Run	6.7%	2.3%	1.2%
Between Day	4%	2%	1.5%

- Exactitud:** El comportamiento de este método (y) fue comparado con el método de Beckman (System Array 360 CE). 35 muestras de concentraciones de Haptoglobina entre 10 y 400 mg/dL fueron analizadas con ambos métodos. El coeficiente de regresión (r) fue de 0,98 y la ecuación de la recta de regresión $y = 0.88x + 4.8$. Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

 Bilirrubina (50 mg/dL), hemoglobina (50 g/L), y factores reumatoides (950 UI/mL), no interfieren. Lípidos (≥ 6 g/L), interfieren. Otras sustancias pueden interferir^{6,7}.

NOTAS

- El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

BIBLIOGRAFIA

- Clinical Guide to Laboratory Tests, Edited by NW Tietz W B Saunders Co., Philadelphia, 483, 1983.
- Dati F et al. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1996; 34:517-520.
- Pesce AJ and Kaplan, LA. Methods in Clinical Chemistry. The CV Mosby Company, St. Louis MO, 1987.
- Kluthe R et al. Nature 1965; 205: 93-94.
- Tarukosky PH et al. Scand J Clin Lab Invest 1966; 18: 80-86.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 4th ed. AACC Pres, 1995.
- Friedman and Young. Effects of disease on clinical laboratory tests, 3th ed. AACC Pres, 1997.

PRESENTACION

Ref.:1102074

Cont.

R1. Diluyente: 1 x 40 mL

R2. Anticuerpo: 1 x 10 mL