

REF	CONTENT		Analizatoriai, su kuriais galima naudoti cobas c pakuotę
05385415 190	Homocysteine Enzymatic Assay (100 tyrimų)	Sistemos-ID 07 7487 1	COBAS INTEGRA 400 plus COBAS INTEGRA 800
05385504 190	HCYS Calibrator Kit (2 x 3 mL)	Sistemos-ID 07 7493 6	
05142423 190	HCYS Control Kit Control 1 (2 x 3 mL) HCYS Control Kit Control 2 (2 x 3 mL)	Sistemos-ID 07 7490 1 Sistemos-ID 07 7492 8	
20756350 322	NaCl Diluent 9 % (6 x 22 mL)	Sistemos-ID 07 5635 0	

Lietuvių

Sistemos informacija

Tyrimas HCYS, tyrimo ID 0-006

Paskirtis

Kiekybinis in vitro tyrimas, skirtas bendro L-homocisteino koncentracijos nustatymui žmogaus serume ir plazmoje, naudojant COBAS INTEGRA sistemas. Tyrimas gali padėti diagnozuoti pacientams įtariamą hiperhomocisteiniją arba homocistinuriją.

Santrauka^{1,2,3}

Homocisteinas (Hcy) yra tiolio grupę turinti amino rūgštis, kuri gaminama ląstelės viduje demetilinant metioniną. Bendras homocisteinas (tHcy) atitinka visų homocisteino formų, tame tarpe oksiduotų, sujungtų su baltymais ir laisvų, sumą.

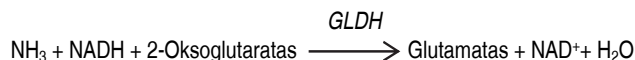
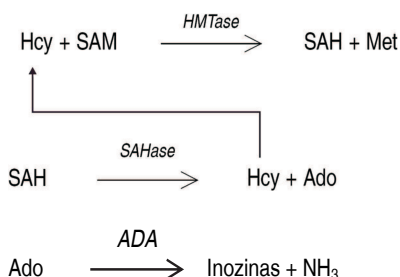
Paaiškėjo, kad padidėjusi tHcy koncentracija yra svarbus rizikos veiksnys vertinant širdies ir kraujagyslių ligas.^{1,2,3} Perteklinis Hcy kiekis kraujotakoje dėl savo dirginančio pobūdžio gali sukelti arterijų pažeidimus ir sąlygoti uždegimą bei plokštelių susidarymą, kurios ilgainiui gali blokuoti širdies kraujotaką.

Padidėjusią tHcy koncentraciją gali sąlygoti keturi pagrindiniai veiksniai:

1. genetinių fermentų, dalyvaujančių Hcy metabolizme, tokių kaip cistionino beta-sintazės (CBS), metionino sintazės (MS) ir metilentetrahidrofolato reduktazės (MTHFR), stoka;
2. maistinis vitaminų B, pvz.: B₆, B₁₂ ir folatų trūkumas;
3. inkstų nepakankamumas veiksmingai šalinti amino rūgštis; ir
4. vaistų, trikdančių Hcy metabolizmą, pvz.: azoto oksido, metotreksato ir fenitoino, poveikis. Padidėjusi tHcy koncentracija taip pat buvo susieta su Alzheimerio liga⁴, neuropsichiatrinėmis ligomis⁵ ir osteoporozė.⁶ Neseniai sukurtos gairės, skirtos tHcy nustatymui klinikinėse laboratorijose.^{7,8}

Tyrimo principas

Homocysteine Enzymatic Assay yra pagrįstas nauju cikliniu fermentiniu tyrimo principu, kuris vietoj Hcy kosubstratų ar Hcy konversijos produktų nustatymo, nustato kosubstrato konversijos produktą. Šiame tyrime oksiduotas Hcy yra pirma redukuojamas iki laisvo Hcy, kuris tuomet, katalizuojant S-metiltransferazei, reaguoja su kosubstratu S-adenozilmetioninu (SAM), susidarant metioninui (Met) ir S-adenozilhomocisteinui (SAH). SAH nustatomas naudojant poruotų fermentų reakcijas, kur SAH hidrolizuojamas į adenoziną (Ado) ir Hcy, veikiant SAH hidrolazei, ir Hcy yra įjungiamas į Hcy konversijos reakcijos ciklą, susidarant reakcijos ciklui, kuris sustiprina aptikimo signalą. Susidaręs Ado yra iškart hidrolizuojamas į inoziną ir amoniaką. Paskutinio žingsnio metu fermentas glutamato dehidrogenazė (GLDH) katalizuoja amoniako reakciją su 2-oksoglutaratu ir NADH, susidarant NAD⁺. Hcy koncentracija mėginyje yra tiesiogiai proporcinga NADH konvertuoto į NAD⁺ kiekiui ($\Delta A_{340\text{ nm}}$).



Reagentai - darbiniai tirpalai

R1 NADH reagentas

S-adenozilmetioninas 0.1 mmol/L; TCEP^{a)} > 0.5 mmol/L; 2-oksoglutaratas < 5.0 mmol/L; NADH > 0.2 mmol/L; buferis, pH 9.1 (25 °C); konservantas; stabilizatorius

R2 Fermento reagentas

Homocisteino S-metiltransferazė (HMTazė) 5.0 kU/L, glutamato dehidrogenazė (GLDH) 10 kU/L, kazeinas (galvijų) ≤ 0.2 %, buferis, pH 7.2 (25 °C), konservantas, detergentas

SR Pradžios reagentas

Adenozino deaminazė (galvijų) 5.0 kU/L, S-adenozil-homocisteino hidrolazė (SAHazė) 3.0 kU/L, kazeinas (galvijų) ≤ 0.2 %, buferis, pH 7.2 (25 °C), konservantas, stabilizatorius

a) Tri(2-karboksietil)fosfinas

R1 yra pozicijoje A, R2 yra pozicijoje B, o SR yra pozicijoje C.

Atsargumo priemonės ir įspėjimai

Atkreipkite dėmesį į atsargumo priemones ir įspėjimus išvardytus šio pakuotės lapelio 1 skyriuje/įžangoje.

Reagentų paruošimas

Paruoštas naudojimui

Laikymo sąlygos ir stabilumas

Tinkamumo laikas 2-8 °C temperatūroje

Žr. galiojimo datą ant
cobas c pakuotės
etiketės

COBAS INTEGRA 400 plus sistema

Naudojant analizatoriuje 10-15 °C temperatūroje

4 savaitės

COBAS INTEGRA 800 sistema

Naudojant analizatoriuje 8 °C temperatūroje 4 savaitės

Mėginių surinkimas ir paruošimas

Mėginių surinkimui ir paruošimui naudokite tik tinkamus mėgintuvėlius ar surinkimo talpyklas.

Buvo patikrinti ir yra priimtini tik toliau išvardyti mėginiai.

Serumas

Plazma: Li-heparino, K₂-EDTA ir K₃-EDTA plazma

Svarbu iškart po surinkimo centrifuguoti kraujo mėginius tam, kad nuo kraujo ląstelių būtų atskirta plazma. Jeigu negalima iškart centrifuguoti, surinkto kraujo mėginiai turėtų būti laikomi lede ir centrifuguoti per valandą. Hcy tyrime nerekomenduojama naudoti hemolizuotų bei drumstų mėginių arba labai lipemiškų mėginių.

Išvardintų rūšių mėginiai buvo tiriami, pasirinkus tyrimo metu rinkoje buvusius mėgintuvėlius, t.y. nebuvo patikrinti visų gamintojų mėgintuvėliai. Įvairių gamintojų mėginių surinkimo sistemose gali būti skirtingų medžiagų, kurios kai kuriais atvejais gali paveikti tyrimo rezultatus. Jei mėginius apdorojate pirminiuose mėgintuvėliuose (mėginių surinkimo sistemose), laikykitės mėgintuvėlių gamintojo instrukcijų.

Prieš atlikdami tyrimą, mėginius su nuosėdomis centrifuguokite.

Stabilumas: ^{8,9,10}	4 dienos 15-25 °C temperatūroje
	4 savaitės 2-8 °C temperatūroje.
	10 mėnesių -20 °C temperatūroje

Pateiktos medžiagos

Apie reagentus skaitykite skyriuje „Reagentai - darbiniai tirpalai“.

Reikalingos (bet nepateikiamos) medžiagos

NaCl Diluent 9 %, Kat. Nr. 20756350 322, sistemos-ID 07 5635 0, skirtas automatiniam mėginių skiedimui ir kalibratorių serijiniams skiedimams. NaCl Diluent 9 % yra patalpinamas į iš anksto jam skirtą stovą vietą ir yra stabilus 4 savaites COBAS INTEGRA 400 plus/800 analizatoriuose.

Tyrimas

Kad tyrimas būtų atliktas tinkamai, laikykitės šiame dokumente pateiktų analizatoriaus naudojimo instrukcijų. Specifines analizatoriaus tyrimo instrukcijas skaitykite atitinkamame naudotojo vadove.

Pritaikymas serumui ir plazmai**COBAS INTEGRA 400 plus tyrimo apibūdinimas**

Matavimo režimas	Absorbicija
Abs. skaičiavimo režimas	Kinetinis
Reakcijos režimas	R1/R2-S-SR
Reakcijos kryptis	Sumažėjimas
Bangos ilgis A/B	340/659 nm
Kalk. pirmas/paskutinis	50/62
Vienetas	μmol/L

Išpilstymo parametrai

		Skiediklis (H ₂ O)
R1	175 μL	–
R2	27 μL	–
Mėginys	14 μL	–
SR	18 μL	–
Bendras tūris	234 μL	

COBAS INTEGRA 800 tyrimo apibrėžimas

Matavimo režimas	Absorbicija
Abs. skaičiavimo režimas	Kinetinis
Reakcijos režimas	R1/R2-S-SR
Reakcijos kryptis	Sumažėjimas
Bangos ilgis A/B	340/659 nm
Kalk. pirmas/paskutinis	73/95
Vienetas	μmol/L

Išpilstymo parametrai

		Skiediklis (H ₂ O)
R1	175 μL	–
R2	27 μL	–
Mėginys	14 μL	–
SR	18 μL	–
Bendras tūris	234 μL	

Kalibravimas

Kalibratoriai	HCYS Calibrator Kit
	Kalibravimo skiedimo santykis:
	1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:18
	prietaiso atliekamas automatiškai

Kalibravimo režimas	Logit/log 5
Kalibravimo pakartojimas	Rekomenduojamas dubliavimas
Kalibravimo dažnis	Pilnas kalibravimas
	<ul style="list-style-type: none"> kas 7 dienas po reagentų partijos pakeitimo kaip reikalaujama remiantis kokybės kontrolės procedūromis

Atsekamumas: Šis metodas buvo standartizuotas pagal NIST SRM 1955 pamatinę medžiagą.

Kokybės kontrolė

Kokybės kontrolei, naudokite medžiagas išvardintas „Užsakymo informacija“ skyriuje. Papildomai galima naudoti kitą tinkamą kontrolinę medžiagą.

Kontrolės intervalai ir apribojimai turėtų atitikti kiekvienos laboratorijos individualius reikalavimus. Gautos reikšmės turėtų patekti į nustatytas ribas. Kiekviena laboratorija turi numatyti korekcines priemones, kurių reiktų imtis, reikšmėms nepatekus į nustatytas ribas.

Vadovaukitės nustatytais valstybiniais ir vietiniais reikalavimais kokybės kontrolei užtikrinti.

Skaiciavimas

COBAS INTEGRA analizatoriai automatiškai apskaičiuoja kiekvieno mėginio analizės koncentraciją. Išsamesnės informacijos ieškokite duomenų analizės (angl. Data Analysis) skylyje internetinėje pagalboje (angl. Online Help) (COBAS INTEGRA 400 plus/800 analizatoriai).

Apribojimai - poveikiai

Kriterijus: Vertės suradimas $\pm 1.5 \mu\text{mol/L}$ pradinės reikšmės mėginiam, kurių koncentracija $\leq 15 \mu\text{mol/L}$ ir $\pm 10 \%$ mėginiam, kurių koncentracija $> 15 \mu\text{mol/L}$.

Gelta:¹¹ Jokio reikšmingo poveikio, I indekso reikšmei esant iki 20 (apytikslė konjuguoto ir nekonjuguoto bilirubino koncentracija: 342 μmol/L arba 20 mg/dL).

Hemolizė:¹¹ Jokio reikšmingo poveikio, H indekso reikšmei esant iki 100 (apytikslė hemoglobino koncentracija: 62 μmol/L arba 100 mg/dL).

Lipemija (Intralipidai):¹¹ Jokio reikšmingo poveikio, L indekso reikšmei esant iki 250. Tarp L indekso (atitinka turbidiskumą) ir trigliceridų koncentracijos koreliacija yra silpna.

Vaistai: Nebuvo nustatyta jokios įtakos naudojant įprastus vaistus terapinėmis koncentracijomis.^{12,13} Išimty: 0.5 mmol/L glutatonas, 100 μmol/L cistationinas, 0.5 mmol/L piruvatas.

Pacientai, vartojantys metotreksatą, karbamazepiną, fenitoiną, azoto oksidą, antikonvulsantus ar 6-azuridino triacetatą, dėl sąveikos su Hcy metabolizmu, gali turėti didesnę Hcy koncentraciją.^{7,10}

S-adenozilhomocisteinas (SAH) daro stiprų teigiamą poveikį. Tačiau, SAH normalioje plazmoje aptinkamas tik žemesnėmis už nmol/L koncentracijomis ir neturėtų sukelti problemų.¹⁴

Hcy gamybos eritrocituose slopinimui, buvo pasiūlyta pridėti 3-deazadenozino. Tačiau su Homocysteine Enzymatic Assay negalima naudoti mėginių turinčių 3-deazadenozino, kadangi jis slopina vieną iš pagrindinių tyrimo naudojamų fermentų.

Labai retais atvejais gamapatijos, ypač IgM tipo (Waldenström makroglobulinemija), gali sąlygoti nepatikimus rezultatus.¹⁵

Diagnozuojant, rezultatai visada turėtų būti vertinami kartu su paciento anamneze, fizinio ištyrimo duomenimis ir kitais radiniais.

REIKALINGI VEIKSMAI

Speciali plovimo programa: Specialių plovimo žingsnių naudojimas yra būtinas, kai COBAS INTEGRA analizatoriuose kartu atliekamos tam tikrų tyrimų kombinacijos. Detalesnių instrukcijų ir vėliausios papildomo plovimo ciklo sąrašo versijos ieškokite CLEAN metodo lape.

Esant reikalui, prieš pranešant šio tyrimo rezultatus turi būti įvykdoma speciali plovimo/pernašos išvengimo programa.

Apribojimai ir reikšmių ribos**Matavimų ribos**

3-50 µmol/L

Apatinė ir viršutinė matavimo intervalo ribos priklauso nuo kalibratoriaus reikšmės.

Didesnės koncentracijos mėginius tirkite naudodami pakartotinio tyrimo funkciją. Naudojant pakartotinio tyrimo funkciją, mėginių skiedimo santykis yra 1:5. Mėginių, atskiestų naudojant pakartotinio tyrimo funkciją, rezultatai yra automatiškai padauginami iš koeficiento 5.

Matavimo reikšmių apatinės ribos

Tuščioji riba, nustatymo riba ir kiekybinio nustatymo riba:

Tuščioji riba = 3 µmol/L

Nustatymo riba = 3 µmol/L

Kiekybinio nustatymo riba = 5.5 µmol/L

Tuščioji riba, aptikimo riba ir kiekybinio nustatymo riba buvo nustatyta pagal CLSI (Klinikinių ir laboratorinių standartų institutas, angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) EP17-A reikalavimus.

Tuščioji riba yra 95-osios procentilės vertė, gauta iš mėginių, kuriuose nebuvo analizuojamosios medžiagos $n \geq 60$ matavimų keliose nepriklausomose serijose. Tuščioji riba atitinka mažiausią koncentraciją, žemiau kurios tikimybė aptikti mėginius be analizuojamosios medžiagos yra 95 %.

Nustatymo riba yra nustatoma pagal tuščiąją ribą ir žemos koncentracijos mėginių standartinių nuokrypį.

Nustatymo riba atitinka žemiausią analitės koncentraciją, kurią galima nustatyti (reikšmė virš tuščiojo matavimo ribos su 95 % tikimybe).

Kiekybinio nustatymo riba yra mažiausia analitės koncentracija, kurią galima atkurti išmatuoti su 30 % paklaida. Ji buvo nustatyta naudojant mažos koncentracijos homocisteino mėginius.

Tikėtinos reikšmės

Daugumoje JAV klinikinių laboratorijų, kaip ribinė normalios Hcy koncentracijos reikšmė suaugusiems naudojama 15 µmol/L.

Europos laboratorijose, kaip ribinė normalios Hcy koncentracijos reikšmė suaugusiems naudojama 12 µmol/L.⁸

Amžius, nėštumas ir inkstų funkcija yra svarbūs. Turi būti įvertintas folio rūgšties, kaip papildas ar per pagraisintą maistą, naudojimas:

Grupė	Folatus papildomai naudojantys	Nenaudojantys
Nevalgius/bazinis tHcy, µmol/L		
Nėštumas	8	10
Vaikai < 15 metų	8	10
Suaugusieji 15-65 metų	12	15
Pagyvenę > 65 metų	16	20

Kiekviena laboratorija turėtų įvertinti tikėtinų reikšmių tinkamumą savų pacientų populiacijai ir, jei būtina, nustatyti savo rekomenduojamas reikšmes.

Specifiniai tyrimo atlikimo duomenys

Toliau pateikiami atitinkamų analizatorių tyrimo charakteristikų duomenys. Atskirose laboratorijose gauti rezultatai gali skirtis.

Glaudumas

Glaudumas buvo nustatytas naudojant žmonių mėginius ir kontrolines medžiagas, remiantis CLSI (angl. Clinical and Laboratory Standards Institute) EP5 reikalavimais, su atkartojamumu ($n = 21$) ir tarpiniu glaudumu (2 lygios dalys per vieną tyrimą, 2 tyrimai per dieną, 21 diena). Buvo gauti šie rezultatai:

Atkartojamumas	Vidurkis µmol/L	SD µmol/L	CV %
Homocysteine Control 1	12.2	0.1	1.0
Homocysteine Control 2	38.9	0.5	1.3

Atkartojamumas	Vidurkis µmol/L	SD µmol/L	CV %
Žmogaus serumas 1	8.47	0.09	1.1
Žmogaus serumas 2	13.5	0.1	0.9
Žmogaus serumas 3	31.2	0.3	0.9
Žmogaus serumas 4	45.5	0.6	1.4

Tarpinis glaudumas	Vidurkis µmol/L	SD µmol/L	CV %
Homocysteine Control 1	12.2	0.2	1.4
Homocysteine Control 2	38.9	0.6	1.5
Žmogaus serumas 1	8.47	0.11	1.3
Žmogaus serumas 2	13.5	0.2	1.4
Žmogaus serumas 3	31.2	0.5	1.4
Žmogaus serumas 4	45.5	0.8	1.7

Metodų palyginimas

Žmogaus serumo mėginių Hcy reikšmės, gautos COBAS INTEGRA 800 analizatoriuje (y), buvo palygintos su reikšmėmis, gautomis naudojant tą patį reagentą COBAS INTEGRA 400 analizatoriuje (x).

Imties dydis (n) = 56

Passing/Bablok¹⁶

$y = 1.00x + 0.144 \text{ µmol/L}$

$r = 0.967$

Tiesinė regresija

$y = 1.04x - 0.224 \text{ µmol/L}$

$r = 0.998$

Mėginių koncentracijų reikšmės buvo apytiksliai nuo 3.39 iki 46.8 µmol/L.

Nuorodos

- Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131(5):363-375.
- Scott J, Weir D. Homocysteine and cardiovascular disease. *Q J Med* 1996;89(8):561-563.
- Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337(4):230-236.
- Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346(7):476-483.
- Stanger O, Fowler B, Piertzik K, et al. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* 2009;9(9):1393-1412.
- McLean RR, Jacques PF, Selhub J, et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004;350(20):2042-2049.
- Refsum H. Total Homocysteine: Guidelines for Determination in the Clinical Laboratory. *Clin Lab News* 2002 May;12-14 (www.aacc.org).
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion. *Clin Chem* 2004;50(1):3-32.
- Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, et al. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993 Feb;39(2):263-271.
- Rasmussen K and Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:627-648.
- Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470-475.
- Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:385-386.
- Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. *Ann Clin Biochem* 2001;38:376-385.

- 14 Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, et al. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? Nephrol Dial Transplant 1998;13(3):656-661.
- 15 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. Clin Chem Lab Med 2007;45(9):1240-1243.
- 16 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. J Clin Chem Clin Biochem 1988 Nov;26(11):783-790.

Šiuose informaciniuose lapeliuose kaip dešimtainės trupmenos skyriklis visada naudojamas taškas, skiriantis sveikąjį skaičių nuo dešimtainės trupmenos skaitmenų. Tūkstančių skyrikliai nenaudojami.

Simboliai

Roche Diagnostics papildomai naudoja šiuos simbolius ir ženklus, be išvardintų standarte ISO 15223-1.

CONTENT

Rinkinio turinys



Tūris po atskiedimo arba maišymo

Reikšmingi papildymai ar pakeitimai yra pažymėti pakeitimų juosta paraštėje.

© 2014, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

