

Užsakymo informacija

REF	CONTENT	Analizatorius (-iai), su kuriuo (-iais) galima naudoti cobas c pakuotę (-es)
05385415 190	Homocysteine Enzymatic Assay 100 tyrimų	Sistemos-ID 07 7487 1 Roche/Hitachi cobas c 311, cobas c 501/502
05385504 190	HCYS Calibrator Kit (2 x 3 mL)	Kodas 590 (HCYCA)
05142423 190	HCYS Control Kit Control 1 (2 x 3 mL)	Kodas 254 (HCYC1)
	HCYS Control Kit Control 2 (2 x 3 mL)	Kodas 255 (HCYC2)
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	Sistemos-ID 07 6869 3

Lietuvių

Sistemos informacija

Skirta **cobas c** 311/501 analizatoriams:**HCYS**: ACN 778**cobas c** 502 analizatoriui:**HCYS**: ACN 8778

Paskirtis

Kiekybinis in vitro tyrimas, skirtas bendro L-homocisteino koncentracijos nustatymui žmogaus serume ir plazmoje, naudojant Roche/Hitachi **cobas c** 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.

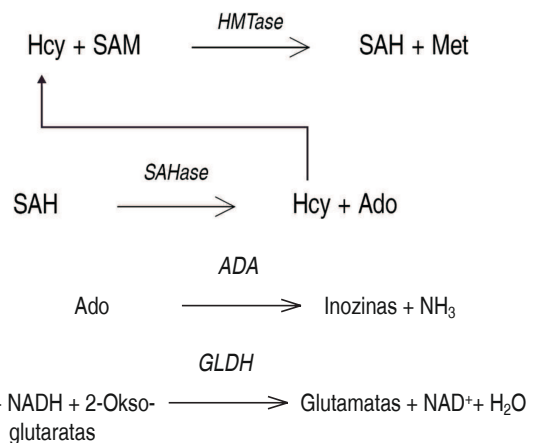
Paaiškėjo, kad padidėjusi tHcy koncentracija yra svarbus rizikos veiksnys vertinant širdies ir kraujagyslių ligas.^{1,2,3} Perteklinis Hcy kiekis kraujotakoje dėl savo dirginančio pobūdžio gali sukelti arterijų pažeidimus ir sąlygoti uždegimą bei plokštelių susidarymą, kurios ilgainiui gali blokuoti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

Padidėjusią tHcy koncentraciją gali sąlygoti keturi pagrindiniai veiksniai:

1. genetinių fermentų, dalyvaujančių Hcy metabolizme, tokių kaip cistationino 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 osteoporoze.⁶ Yra nustatytos 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 adoziną (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* > 0.5 mmol/L, 2-oksoglutaratas < 5.0 mmol/L, NADH > 0.2 mmol/L, buferis, pH 9.1 (25 °C), konservantas, stabilizatorius

R2 Fermentinis 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

R3 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

*Tri(2-karboksietil)fosfinas

R1 yra A pozicijoje, R2 yra B pozicijoje, o R3 yra C pozicijoje.

Atsargumo priemonės ir įspėjimai

Skirtas naudoti in vitro diagnostikai.

Laikytis įprastų atsargumo priemonių, būtinų dirbant su visais laboratorijos reagentais.

Visos atliekos turi būti tvarkomos laikantis vietos reikalavimų.

Saugos duomenų lapas pateikiamas profesionaliems naudotojams paprašius.

Reagentų paruošimas

Paruoštas naudojimui

Laikymo sąlygos ir stabilumas

HCYS

Tinkamumo laikas 2-8 °C temperatūroje:

Naudojamo ir šaldomo analizatoriuje:

Diluent NaCl 9 %

Žr. galiojimo datą ant **cobas c** pakuotės etiketės.

4 savaitės



Tinkamumo laikas 2-8 °C temperatūroje: Žr. galiojimo datą ant **cobas c** pakuotės etiketės.

Naudojamo ir šaldomo analizatoriuje: 12 savaičių

Neužšaldykite.**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 mėgintuvėlių. 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.

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

Prieš atlikdami tyrimą, mėginius su nuosėdomis centrifuguokite.

Pateiktos medžiagos

Apie reagentus skaitykite skyriuje „Reagentai - darbiniai tirpalai“.

Reikalingos (bet nepateikiamos) medžiagos

Skaitykite skyriuje „Užsakymo informacija“

Bendra laboratorijos įranga

Tyrimas

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

Pritaikymų nepatvirtintų Roche veikimas nėra užtikrintas ir turi būti apibrėžtas vartotojo.

Pritaikymas serumui ir plazmai**cobas c 311 tyrimo apibūdinimas**

Tyrimo tipas	2-taškų, baigtinis
Reakcijos laikas/Tyrimo taškai	10 / 36-57
Bangos ilgis (sub/pagrindinės)	700/340 nm
Reakcijos kryptis	Sumažėjimas
Vienetai	μmol/L
Reagentų išpildymas	Skiediklis (H ₂ O)
R1	176 μL –
R2	28 μL –
R3	20 μL –
Mėginio tūris	Mėginys Mėginio skiedimas
	Mėginys Skiediklis (NaCl)

Normalus	14 μL	–	–
Sumažėjęs	14 μL	30 μL	120 μL
Padidėjęs	14 μL	–	–

cobas c 501/502 tyrimo apibūdinimas

Tyrimo tipas	2-taškų, baigtinis		
Reakcijos laikas/Tyrimo taškai	10 / 51-70		
Bangos ilgis (sub/pagrindinės)	700/340 nm		
Reakcijos kryptis	Sumažėjimas		
Vienetai	μmol/L		
Reagentų išpildymas		Skiediklis (H ₂ O)	
R1	176 μL	–	
R2	28 μL	–	
R3	20 μL	–	
Mėginio tūris	Mėginys	Mėginio skiedimas	
		Mėginys	Skiediklis (NaCl)
Normalus	14 μL	–	–
Sumažėjęs	14 μL	30 μL	120 μL
Padidėjęs	14 μL	–	–

Kalibravimas

Kalibratoriai	S1-5: HCYS Calibrator Kit
	Tam, kad nustatytumėte 5-taškų kalibracinės kreivės etalonų reikšmes, padauginkite partijai specifinio HCYS Calibrator Kit kalibratoriaus reikšmes iš žemiau pateikiamų faktorių:
	S1: 0.050 S4: 0.500
	S2: 0.100 S5: 1.00
	S3: 0.250
Kalibravimo režimas	RCM
Kalibravimo dažnis	Pilnas kalibravimas
	• kas 7 dienas
	• po reagentų partijos pakeitimo
	• kaip reikalaujama vadovaujantis 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.

Skaičiavimas

Roche/Hitachi **cobas c** sistemos automatiškai apskaičiuoja kiekvieno mėginio analitės koncentraciją.



Apribojimai - poveikiai

Kriterijus: vertės suradimas $\pm 10\%$ pradinės reikšmės, kai analitės koncentracija $> 15 \mu\text{mol/L}$ ar $\leq \pm 1.5 \mu\text{mol/L}$, kai analitės koncentracija $\leq 15 \mu\text{mol/L}$.

Gelta:¹¹ Jokio reikšmingo poveikio, I indekso reikšmei esant iki 20 (apytikslė konjuguoto ir nekonjuguoto bilirubino koncentracija: $342 \mu\text{mol/L}$ (20 mg/dL)).

Hemolizė:¹¹ Jokio reikšmingo poveikio, H indekso reikšmei esant iki 100 (apytikslė hemoglobino koncentracija: $62 \mu\text{mol/L}$ (100 mg/dL)).

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

Vaistai: Nebuvo nustatyta jokios įtakos naudojant įprastus vaistus terapinėmis koncentracijomis.^{12,13}

Išimtys: 0.5 mmol/L glutationas, $100 \mu\text{mol/L}$ 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 yra neaptinkamas 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 gamapatijios, 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

Specialaus plovimo programa: Specialių plovimo žingsnių naudojimas yra būtinas, kai Roche/Hitachi **cobas c** sistemose kartu atliekamos tam tikrų tyrimų kombinacijos. Naujausias pernašos išvengimo sąrašas pateikiamas kartu su NaOHD/SMS/Multiclean/SCCS arba NaOHD/SMS/SmpCln1+2/SCCS metodų lapeliuose. Išsamesnių instrukcijų ieškokite naudotojo vadove. **cobas c** 502 analizatorius: Visa specialaus plovimo programa, skirta pernešimui išvengti, yra prieinama per **cobas** link, rankinis informacijos suvedimas nereikalingas.

Kai reikalaujama, prieš pranešant šio tyrimo rezultatus turi būti įgyvendinama specialaus plovimo/pernešimo išvengimo programa.

Apribojimai ir reikšmių ribos**Matavimų ribos**

$3\text{--}50 \mu\text{mol/L}$

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 (angl. Limit of Blank - LoB), nustatymo riba (angl. Limit of Detection - LoD) ir kiekybinio nustatymo riba (angl. Limit of Quantitation - LoQ)

LoB = $3 \mu\text{mol/L}$

LoD = $3 \mu\text{mol/L}$

LoQ = $5.5 \mu\text{mol/L}$

Tuščiojo matavimo riba ir nustatymo riba buvo nustatytos atsižvelgiant į CLSI (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 standartinį 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 klininių laboratorijų, kaip ribinė normalios Hcy koncentracijos reikšmė suaugusiems naudojama $15 \mu\text{mol/L}$.

Europos laboratorijose, kaip ribinė normalios Hcy koncentracijos reikšmė suaugusiems naudojama $12 \mu\text{mol/L}$.⁸

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

Grupė	Folatus papildomai naudojantys	Nenaudojantys
Nevalgius/bazinis tHcy, $\mu\text{mol/L}$		
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 $\mu\text{mol/L}$	SD $\mu\text{mol/L}$	CV %
Homocysteine Control 1	12.2	0.2	1.5
Homocysteine Control 2	39.1	0.7	1.8
Žmogaus serumas 1	8.26	0.16	2.0
Žmogaus serumas 2	13.1	0.2	1.8
Žmogaus serumas 3	30.0	0.4	1.4
Žmogaus serumas 4	44.4	0.9	2.0
Tarpinis glaudumas	Vidurkis $\mu\text{mol/L}$	SD $\mu\text{mol/L}$	CV %
Homocysteine Control 1	12.2	0.3	2.1
Homocysteine Control 2	39.1	0.8	2.0
Žmogaus serumas 1	8.26	0.19	2.3
Žmogaus serumas 2	13.1	0.3	2.1
Žmogaus serumas 3	30.0	0.5	1.8
Žmogaus serumas 4	44.4	1.0	2.2



Metodų palyginimas

Žmogaus serumo mėginių Hcy reikšmės, gautos **cobas c 501** analizatoriuje (y), buvo palygintos su reikšmėmis, gautomis naudojant tą patį reagentą COBAS INTEGRA 400 analizatoriuje (x).

Imties dydis (n) = 56

Passing/Bablok¹⁶

$y = 0.962x + 0.248 \mu\text{mol/L}$

$\tau = 0.971$

Tiesinė regresija

$y = 0.993x - 0.175 \mu\text{mol/L}$

$r = 0.999$

Mėginių koncentracijų reikšmės buvo apytiksliai nuo 3.03 iki 47.2 $\mu\text{mol/L}$.

Nuorodos

- 1 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.
- 2 Scott J, Weir D. Homocysteine and cardiovascular disease. *Q J Med* 1996;89(8):561-563.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 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.
- 6 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.
- 7 Refsum H. Total Homocysteine: Guidelines for Determination in the Clinical Laboratory. *Clin Lab News* 2002 May;12-14 (www.aacc.org).
- 8 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.
- 9 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.
- 10 Rasmussen K and Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:627-648.
- 11 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470-475.
- 12 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:385-386.
- 13 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

Be išvardytų standarte ISO 15223-1, Roche Diagnostics taip pat naudoja šiuos simbolius ir ženklus.

CONTENT



Rinkinio turinys

Tūris po atskiedimo arba maišymo

Reikšmingi papildymai ar pakeitimai yra pažymėti pakeitimų juosta parašėje.

© 2013, Roche Diagnostics



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

