



ENZYMATIC HOMOCYSTEINE ASSAY
DOSAGE ENZYMATIQUE POUR L' HOMOCYSTEINE
ENZYMATISCHER HOMOCYSTEINASSAY
ANALISI OMOCISTEINA ENZIMATICA
ENSAYO DE HOMOCISTEÍNA ENZIMÁTICA
ENZYMATISK HOMOCYSTEINANALYS
ENZYMATISK HOMOCYSTEINANALYSE
TEST NA ENZYMATICKÝ HOMOCYSTEIN
ENZYMATICKÝ KVANTITATÍVNY ROZBOR
HOMOCYSTEÍNU

IVD

REF FHER100



For professional use only
Usage réservé aux professionnels
Nur für den Fachgebrauch
Solo per uso professionale
Para uso profesional únicamente
Endast för professionellt bruk
Kun til fagligt brug
Pouze pro odborné použití
Iba na profesionálne použitie



Axis-Shield Diagnostics Limited
The Technology Park, Dundee, DD2 1XA, United Kingdom
Tel: +44 (0) 1382 422000 Fax: +44 (0) 1382 422088
E-mail: shield@uk.axis-shield.com
Web: www.axis-shield.com

ENGLISH:**INTENDED USE**

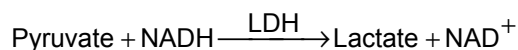
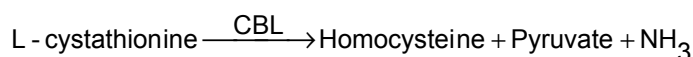
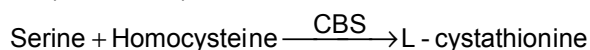
The Enzymatic Homocysteine Assay is intended for *in vitro* quantitative determination of total homocysteine in human serum and plasma. This assay is for professional use only.



INTRODUCTION

Homocysteine (HCY) is a by-product of protein metabolism, specifically the breakdown of the essential amino acid, methionine. It is not by itself incorporated into proteins but is further broken down by enzymes into cysteine or is converted back to methionine. In small amounts homocysteine is not harmful to the body or blood vessels, but when excess amounts accumulate in the blood stream, arterial vessels may be damaged and the resulting inflammation may eventually cause blockage of blood to the heart. Clinical studies began in 1969, when Dr. Kilmer S. McCully reported that children born with a genetic error of metabolism that causes elevated homocysteine levels (homocystinuria) died with advanced artery disease at a very young age¹. More recent studies are yielding evidence that elevated blood levels of homocysteine have a predictive value for risk of coronary artery disease similar to that of elevated cholesterol levels^{2,3}. Recent evidence has also implicated elevated blood levels of homocysteine in miscarriages and birth defects⁴.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

Bound or dimerised homocysteine (oxidised form) is reduced to free homocysteine, which then reacts with serine catalysed by cystathionine beta-synthase (CBS) to form L-cystathionine. Cystathionine in turn is broken down by cystathionine beta-lyase (CBL) to form homocysteine, pyruvate and ammonia. Pyruvate is then converted by lactate dehydrogenase (LDH) to lactate with NADH as coenzyme. The rate of NADH conversion to NAD is directly proportional to the concentration of homocysteine ($\Delta A_{340\text{ nm}}$).

**KIT COMPONENTS**

Enzymatic Homocysteine Reagent R1	Clear odourless liquid	1 x 36ml in Amber Vial	NADH (0.56mM), LDH (65KU/L), Serine (1.3mM), Trizma Base 1-10%, Trizma Hydrochloride 1-10%, Sodium Azide <1%. Ready-to-use	
Enzymatic Homocysteine Reagent R2	Clear odourless liquid	1 x 15ml in Clear Vial	Reductant (TCEP;25mM). Ready-to-use	
Enzymatic Homocysteine Reagent R3	Pale yellow odourless liquid	1 x 5ml in Amber Vial	Cycling Enzymes CBS (0.748KU/L) and CBL (16.4KU/L) Sodium Azide <1%. Ready-to-use	
Enzymatic Homocysteine Calibrator 1	Clear odourless liquid	1 x 3ml in Clear Vial (Blue Cap)	Aqueous homocysteine blank (0µmol/L). Ready-to-use	
Enzymatic Homocysteine Calibrator 2	Clear odourless liquid	1 x 3ml in Clear Vial (Red Cap)	Aqueous homocysteine solution (27µmol/L). Ready-to-use	

The calibrators are prepared gravimetrically and are traceable to a designated measurement procedure (HPLC). The values are printed on the labels (0µmol/L and 27µmol/L).

STORAGE OF REAGENTS

Handling and Procedural Notes

The Enzymatic Homocysteine Reagents and Calibrators should be stored refrigerated at 2-8°C. **DO NOT FREEZE.** The reagents and calibrators are stable when stored as supplied until the expiration dates on the labels. The reagents are stable on board the instrument for up to 30 days. Do not mix lots of reagents.

Specimen Collection and Handling

Fresh EDTA or heparinised plasma free of haemolysis or turbidity is the recommended specimen for measurement of homocysteine. Serum collected in serum separator tubes may also be used. However, it is not recommended to use individual patient results from serum, heparinised plasma and EDTA plasma interchangeably. All samples must be placed on ice immediately after collection and should be centrifuged and separated from cells as soon as possible (within one hour). Severely lipaemic specimens are unsatisfactory. Samples should be stored tightly capped at 2-8°C for up to 48 hours, or frozen at -20°C if testing is delayed⁶.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For in vitro diagnostic use only

Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this leaflet, particularly for handling and storage conditions.
2. Reagents R1 and R3 contain sodium azide which can react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with large quantities of water to prevent azide build-up.
3. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available upon request from Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Reagent R1
Reagent R3
Harmful

R22: Harmful if swallowed.

R32: Contact with acids liberates very toxic gas.

S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way.

S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

PREPARATION

Materials Required but not Provided

1. Deionised Water.
2. An analyser capable of dispensing three reagents and of measuring absorbance at 340nm with temperature control (37°C).

ASSAY PROTOCOL⁸

RESULTS

Results are printed out by the Cobas MIRA in µmol/L.

QUALITY CONTROL

Ensure that adequate maintenance and calibration is performed according to the manufacturer's instructions.

Assayed control materials with values for homocysteine in both the normal and abnormal ranges should be tested to validate reagent performance. The range of acceptable control limits should be established by individual laboratories. Axis-Shield provide a set of low, medium and high controls.

REF FHER200

The controls contain L-homocysteine in processed human serum at the following concentrations:

<i>Control</i>	<i>Mean Value HCY (µmol/L)</i>	<i>Range HCY (µmol/L)</i>
<i>Control L</i>	7.0	5.6 – 8.4
<i>Control M</i>	12.5	10.0 – 15.0
<i>Control H</i>	25.0	20.0 – 30.0

PERFORMANCE DATA

(Established on the Cobas MIRA)

Accuracy

Correlation studies were performed with fresh plasma from adults. All samples were analysed using the enzymatic assay, Abbott FPIA assay and the Pacific Biometrics, Inc. HPLC assay. The data obtained gave the following statistical values:

Comparison Method	Abbott FPIA	HPLC
Number of samples	85	30
Slope of regression line	0.964	1.059
Y-Intercept	0.728	-0.035
Correlation coefficient	0.993	0.989
Range ($\mu\text{mol/L}$)	4.6-51.8	5.1-26.0

Precision

Precision studies were conducted utilising the Enzymatic Homocysteine Assay according to the NCCLS Document EP5-A⁷ protocol. Each human EDTA plasma sample was run in duplicate on forty runs spread over 20 days. Results are summarised below:

Sample	Mean ($\mu\text{mol/L}$)	Within Run CV%	Between Run CV%	Total CV%
1	4.6	6.6	3.1	7.3
2	11.6	3.5	0.7	4.0
3	27.0	1.6	1.5	2.6

Analytical Sensitivity

The analytical sensitivity of the Enzymatic Homocysteine assay was found to be 0.40 $\mu\text{mol/L}$.

Analytical Specificity

The specificity of the assay was assessed for the interfering substances listed in the table below:

Interfering Substance	Interfering Substance Concentration	% Interference
Bilirubin	20 mg/dL	< 5%
Haemoglobin	1000 mg/dL	< 5%
Lipaemia	1000 mg/dL	< 10%
Glutathione	20 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Methionine	800 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Cysteine	200 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Pyruvate	1000 $\mu\text{mol/L}$	< 5%

None of these substances interfered significantly (<10%) in the assay.

Refer to references (5,6) for possible interferences caused by drugs, disease or preanalytical variables

Carryover

Carryover studies show that carryover is less than the sensitivity of the assay.

EXPECTED VALUES

A study was conducted using samples from 131 adults (59 males and 72 females, ages 18-86) who were seemingly healthy. Plasma (EDTA) samples were assayed for total homocysteine by the Enzymatic Homocysteine Assay and the reference range for homocysteine by this method is:

Adult 4.0-15.4 $\mu\text{mol/L}$

These values are to be considered as guidelines for expected values. Each laboratory is encouraged to establish a range of normal values for the population they serve.

LIMITATIONS OF USE

1. The linearity of the Enzymatic Homocysteine Assay when run as directed is 50 $\mu\text{mol/L}$. Samples with values greater than 50 $\mu\text{mol/L}$ should be diluted 1 in 3 in saline and the result multiplied by three ($\times 3$).
2. The R1 reagent should be clear. It should be discarded if it becomes turbid or the initial absorbance is less than 0.700.
3. Cystathionine is measured with Homocysteine, but in the general population the cystathionine level (0.065 to 0.3 $\mu\text{mol/L}$) has a negligible effect. In some occasions the cystathionine levels may rise in renal disease patients with severe metabolic disturbances and cause greater than 20% interference. Although some studies have shown that no patients are affected, others have shown that this effect may be seen in up to 10% of renal disease patients.
4. **Drugs, such as methotrexate, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide, or 6 azauridine triacetate may affect the plasma homocysteine concentration^{5,6}.**

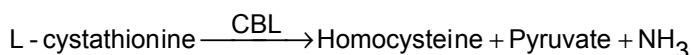
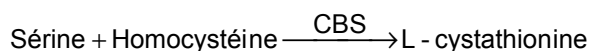
Le Dosage enzymatique pour l'homocystéine est un test pour la détermination quantitative *in vitro* du taux total d'homocystéine dans le sérum et le plasma humains. Ce dosage est réservé aux professionnels.

INTRODUCTION



L'homocystéine (HCY) est un sous-produit du métabolisme des protéines et, plus spécifiquement, de la dégradation de l'acide aminé appelé méthionine. Elle n'est pas en elle-même incorporée dans les protéines mais elle est soit transformée en cystéine par les enzymes après une dégradation plus poussée, soit reconvertie en méthionine. En petites quantités, l'homocystéine n'est pas nocive pour l'organisme ou les vaisseaux sanguins mais, si des quantités excessives s'accumulent dans la circulation sanguine, les vaisseaux artériels risquent d'être lésionnés et l'inflammation qui en découle est susceptible, en fin de compte, de bloquer l'arrivée sang au cœur du sang au. Les études cliniques ont commencé en 1969, quand Dr. Kilmer S. McCully a rapporté que les enfants nés avec une erreur génétique de nature métabolique, ayant pour conséquence une augmentation du taux d'homocystéine (homocystinurie), mouraient d'artériopathie à un stade avancé dès leur plus jeune âge¹. Des études plus récentes apportent à présent des preuves que des taux élevés d'homocystéine constituent une valeur prédictive de risque de coronaropathie, tout comme le sont des taux élevés de cholestérol^{2,3}. Des preuves récentes ont aussi avancé que des taux élevés d'homocystéine avaient été impliqués dans des fausses couches et des malformations congénitales⁴.

PRINCIPE DU DOSAGE

De l'homocystéine liée ou dimérisée (forme oxydée) est réduite en homocystéine à l'état libre, qui réagit ensuite avec de la sérine catalysée par la cystathionine-bêta-synthase (CBS) pour former la L-cystathionine. La cystathionine est dégradée à son tour par la cystathionine-bêta-lyase (CBL) pour donner de l'homocystéine, du pyruvate et de l'ammoniaque. Le pyruvate est alors converti en lactate par la lactate-déshydrogénase (LDH), le NADH étant la coenzyme. Le taux de conversion du NADH en NAD est directement proportionnel à la concentration d'homocystéine (ΔA_{340} nm).



COMPOSANTS DU KIT

Réactif enzymatique pour l'homocystéine R1	Liquide limpide et inodore	1 flacon ambré de 36 ml	NADH (0.56mM), LDH (65KU/L), Sérine (1.3mM), Trizma-base à 1-10 %, Trizma-chlorhydrate à 1-10 %, Azoture de sodium <1 %. Prêt à l'emploi	Xn 
Réactif enzymatique pour l'homocystéine R2	Liquide limpide et inodore	1 flacon transparent de 15 ml	Réducteur (TCEP ; 25mM). Prêt à l'emploi	
Réactif enzymatique pour l'homocystéine R3	Liquide jaune pâle et inodore	1 flacon ambré de 5 ml	Enzymes à cycles CBS (0.748KU/L) et CBL (16.4KU/L) Azoture de sodium <1 %. Prêt à l'emploi	Xn 
Enzymatic Homocystéine étalonneur 1	Liquide limpide et inodore	1 flacon transparent de 3 ml (capuchon bleu)	Blanc aqueux d'homocystéine (0 $\mu\text{mol/L}$). Prêt à l'emploi	
Enzymatic Homocystéine étalonneur 2	Liquide limpide et inodore	1 flacon transparent de 3 ml (capuchon rouge)	Solution aqueuse d'homocystéine (27 $\mu\text{mol/L}$). Prêt à l'emploi	

Les étalonneurs sont préparés gravimétriquement et ils peuvent être rapportés à une technique de mesure désignée (CLHP). Les valeurs sont imprimées sur les étiquettes (0 $\mu\text{mol/L}$ et 27 $\mu\text{mol/L}$).

CONSERVATION DES REACTIFS

Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre

Conserver les réactifs enzymatiques pour l'homocystéine et les Etalonneurs entre 2 et 8°C. **NE PAS CONGELER.** Réactifs et étalonneurs resteront stables jusqu'à la date de péremption figurant sur leurs étiquettes, lorsque conservés tels que fournis. Les réactifs resteront stables dans l'instrument pendant 30 jours maximum. Ne pas mélanger des lots différents de réactifs.

Prélèvement et conservation des échantillons

Il est recommandé d'utiliser du plasma EDTA frais ou du plasma hépariné sans hémolyse ou turbidité à titre d'échantillon pour mesurer le taux d'homocystéine. On peut aussi se servir de sérum recueilli dans des tubes pour séparation de sérum. Cependant, il est déconseillé d'utiliser de façon interchangeable les résultats d'un patient individuel obtenus avec du sérum, du plasma hépariné et du plasma EDTA. Placer les échantillons sur de la glace immédiatement après les avoir prélevés, puis les centrifuger et les séparer des cellules dès que possible (durant l'heure qui suit). Des échantillons très lipémiques ne conviennent pas. Conserver les échantillons dans des tubes bien bouchés entre 2 et 8°C pendant 48 heures maximum, ou bien les congelés à -20°C si les tests sont retardés⁶.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Réservé à l'usage diagnostique in vitro.

Mesures de sécurité

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2. Les Réactifs R1 et R3 contiennent de l'azoture de sodium qui peut réagir avec des tuyaux en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de leur élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.
3. Les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans ce nécessaire peuvent être obtenues sur demande auprès d'Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Réactif R1
Réactif R3
Nocif

R22 : Nocif par ingestion.

R32 : Au contact d'un acide dégage un gaz très toxique.

S36/37/39 : Porter un vêtement de protection approprié, des gants et un équipement de protection des yeux/du visage.

S29/35 : Ne pas jeter les résidus à l'égout. Ne se débarrasser de ce produit et de son récipient qu'en prenant toutes les précautions d'usage.

S46 : En cas d'ingestion, consulter immédiatement un médecin et lui montrer l'emballage ou l'étiquette

PREPARATION

Substances/Équipement requis mais non inclus dans le nécessaire

1. Eau désionisée.
2. Analyseur capable de distribuer trois réactifs et de mesurer l'absorption à 340 nm, avec contrôle de la température (37°C).

PROTOCOLE DU DOSAGE⁸

RESULTATS

Les résultats, exprimés en µmol/L, sont imprimés par le Cobas MIRA.

CONTROLE DE LA QUALITE

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant. En vue de valider la performance des réactifs, tester des substances de contrôle dosées dont les valeurs pour l'homocystéine sont comprises entre les limites normales ainsi qu'anormales. Il est recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres limites en ce qui concerne les témoins acceptables. Axis-Shield fournit un ensemble de témoins faibles, moyens et élevés.

REF FHER200

Les témoins contiennent de la L-homocystéine dans du sérum humain transformé aux concentrations suivantes :

<i>Témoin</i>	<i>Taux moyen de HCY ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>Taux limites de HCY ($\mu\text{mol/L}$)</i>
<i>Témoin F</i>	7,0	5,6 – 8,4
<i>Témoin M</i>	12,5	10,0 – 15,0
<i>Témoin E</i>	25,0	20,0 – 30,0

DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE

(Etablies sur le Cobas MIRA)

Exactitude

Des études de corrélation ont été réalisées avec du plasma frais prélevé chez des adultes. Tous les échantillons ont été analysés avec le dosage enzymatique, le dosage FPIA d'Abbott et le dosage HPLC de Pacific Biometrics, Inc. Les données obtenues ont permis d'obtenir les valeurs statistiques suivantes :

<i>Méthode de comparaison</i>	<i>Abbott FPIA</i>	<i>HPLC</i>
<i>Nombre d'échantillons</i>	85	30
<i>Pente de la ligne de régression</i>	0,964	1,059
<i>Point d'intersection avec l'axe des ordonnées</i>	0,728	-0,035
<i>Coefficient de corrélation</i>	0,993	0,989
<i>Limites ($\mu\text{mol/L}$)</i>	4,6-51,8	5,1-26,0

Précision

Des études de précision ont été réalisées en utilisant le Dosage enzymatique pour l'homocystéine, conformément au protocole du NCCLS, Document EP5-A⁷. Chaque échantillon de plasma EDTA humain a été analysé en double exemplaire dans 40 analyses réparties sur 20 jours. Les résultats sont résumés ci-dessous :

<i>Echantillon</i>	<i>Moyenne ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>Intra-dosages CV %</i>	<i>Inter-dosages CV%</i>	<i>Total CV%</i>
1	4,6	6,6	3,1	7,3
2	11,6	3,5	0,7	4,0
3	27,0	1,6	1,5	2,6

Sensibilité analytique

La sensibilité analytique du dosage enzymatique pour l'homocystéine s'est avérée être de 0,40 $\mu\text{mol/L}$.

Spécificité analytique

La spécificité du dosage a été évaluée pour les substances interférentes figurant dans le tableau ci-dessous :

Substance interférente	Concentration de la substance interférente	% d'interférence
Bilirubine	20 mg/Dl	< 5%
Hémoglobine	1000 mg/Dl	< 5%
Lipémie	1000 mg/Dl	< 10%
Glutathione	20 µmol/L	< 5%
Méthionine	800 µmol/L	< 5%
Cystéine	200 µmol/L	< 5%
Pyruvate	1000 µmol/L	< 5%

Aucune de ces substances n'a causé d'importantes interférences (< 10 %).

Se reporter aux références (5,6) pour des interférences possibles par des médicaments, des états pathologiques ou des variables préanalytiques.

Report

Les études de report ont montré que le report est inférieur à la sensibilité du dosage.

VALEURS ATTENDUES

Une étude a été réalisée en utilisant des échantillons prélevés chez 131 adultes (59 hommes et 72 femmes d'un âge compris entre 18 et 86 ans) qui étaient, apparemment, en bonne santé. Les échantillons de plasma (EDTA) ont été analysés pour déterminer le taux total d'homocystéine au moment du Dosage enzymatique pour l'homocystéine ; les limites de référence pour l'homocystéine avec cette méthode sont indiquées ci-dessous :

Adulte 4,0-15,4 µmol/L

Ces valeurs ne sont données qu'à titre de guide pour les valeurs attendues. Il est conseillé à chaque laboratoire d'établir des valeurs normales limites convenant à la population dont ils analysent les échantillons.

RESTRICTIONS D'UTILISATION

1. La linéarité du Dosage enzymatique pour l'homocystéine, lorsque réalisé selon le mode d'emploi, est de 50 µmol/L. Les échantillons avec des valeurs supérieures à 50 µmol/L doivent être dilués à raison de 1 volume d'échantillon pour 2 volumes de solution salée ; on multiplie ensuite le résultat par trois ($\times 3$).
2. Le réactif R1 doit être limpide : le jeter s'il devient trouble ou si l'absorption initiale est inférieure à 0,700.
3. Le taux de cystathionine est mesuré au moyen de l'homocystéine ; toutefois, le taux de cystathionine (0,065 à 0,3 µmol/L) n'a qu'un effet négligeable chez la plupart des gens. Chez des personnes souffrant d'insuffisance rénale doublée de troubles métaboliques graves, le taux de cystathionine peut quelquefois augmenter et provoquer une interférence supérieure à 20%. Bien que certaines études indiquent qu'aucun patient n'est affecté, d'autres études ont montré que cet effet était observé dans 10 % des cas chez des personnes souffrant d'insuffisance rénale.
4. **Certains médicaments, tels que le méthotrexate, la carbamazépine, la phénytoïne, le protoxyde d'azote ou le 6-azauridine-triacétate, peuvent affecter la teneur du plasma en homocystéine^{5,6}.**

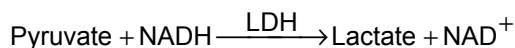
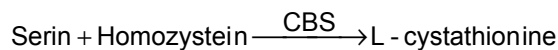
Der enzymatische Homocysteinassay ist zur quantitativen *In-vitro*-Bestimmung des Gesamthomocysteins in Humanserum und -plasma vorgesehen. Der Assay ist nur für den Fachgebrauch bestimmt.

EINLEITUNG



Homocystein (HCY) ist ein Nebenerzeugnis des Proteinstoffwechsels, insbesondere des Abbaus der essentiellen Aminosäure Methionin. HCY wird selbst nicht in Proteine eingebaut, sondern durch Enzyme weiter zum Cystein abgebaut oder wieder zu Methionin remethyliert. In geringen Mengen ist Homocystein für Körper und Blutgefäße ungefährlich, sammeln sich jedoch größere Mengen im Blut an, können Arterien geschädigt werden und eine in der Folge entstehende Entzündung kann schließlich zur Unterbrechung der Blutversorgung des Herzens führen. Klinische Studien begannen 1969, als Dr. Kilmer S. McCully berichtete, dass Kinder mit einem stark erhöhten Homocysteinspiegel (Homocysteinurie) verursacht durch einen genetischen Stoffwechselfehler in sehr jungem Alter an fortgeschrittener Atherosklerose starben¹. Weitere neuere Studien belegen, dass ein erhöhter Homocysteinspiegel im Blut einen vorhersagenden Wert für die Gefahr einer Erkrankung der Herzkranzgefäße hat, der in der Bedeutung dem eines erhöhten Cholesterinspiegels entspricht^{2, 3}. Neuere Ergebnisse weisen außerdem auf die Bedeutung eines erhöhten Homocysteinspiegels im Blut in Zusammenhang mit Fehlgeburten und bei missgebildeten Neugeborenen hin⁴.

ANALYSENPRINZIP

Gebundenes oder dimerisiertes Homocystein (oxidierte Form) wird in freies Homocystein überführt welches anschließend durch Cystathionin-Betasynthase (CBS) katalysiert und mit Serin reagiert, um L-Cystathionin zu bilden. Cystathionin wird wiederum durch Cystathionin-Betalyase (CBL) unter Bildung von Homocystein, Pyruvat und Ammoniak abgebaut. Pyruvat wird anschließend unter Beteiligung des Coenzym NADH durch Laktatdehydrierung (LDH) zu Laktat umgesetzt. Die Geschwindigkeit der NADH-Konvertierung ist direkt proportional zur Konzentration des Homocystein ($\Delta A_{340 \text{ nm}}$).



KIT KOMPONENTEN

Enzymatisches Homocysteinreagens R1	Klare, geruchlose Flüssigkeit	1 x 36 ml in orangefarbenem Fläschchen	NADH (0.56mM), LDH (65KU/L), Serin (1.3mM), Trizma-Base 1-10%, Trizma-Hydrochlorid 1-10%, Natriumazid <1%. Gebrauchsfertig	
Enzymatisches Homocysteinreagens R2	Klare, geruchlose Flüssigkeit	1 x 15 ml in klarem Fläschchen	Reduktionsmittel (TCEP; 25mM). Gebrauchsfertig	
Enzymatisches Homocysteinreagens R3	Blassgelbe, geruchlose Flüssigkeit	1 x 5 ml in orangefarbenem Fläschchen	Zyklierende Enzyme CBS (0.748KU/L) und CBL (16.4KU/L) Natriumazid <1%. Gebrauchsfertig	
Kalibrator 1	Klare, geruchlose Flüssigkeit	1 x 3 ml in klarem Fläschchen (blauer Deckel)	Wässrige Homocysteinblindprobe (0µmol/L). Gebrauchsfertig	
Kalibrator 2	Klare, geruchlose Flüssigkeit	1 x 3 ml in klarem Fläschchen (roter Deckel)	Wässrige Homocysteinlösung (27µmol/L). Gebrauchsfertig	

Die Kalibratoren werden gravimetrisch vorbereitet und sind nach einem designierten Messverfahren (HPLC) verfolgbar. Die Werte sind auf die Etikette gedruckt (0µmol/L und 27µmol/L).

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Handhabungs- und Verfahrenshinweise

Die enzymatischen Homocysteinreagenzien und -Kalibratoren sind bei einer Temperatur von 2-8°C kühl zu lagern. **REAGENZIEN NICHT EINFRIEREN.** Die Reagenzien und Kalibratoren sind im Lieferzustand bei sachgemäßer Lagerung bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten haltbar. In das Instrument geladen, sind die Reagenzien für bis zu 30 Tage haltbar. Unterschiedliche Chargen der Reagenzien nicht mischen.

PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG

Für die Messung des Homocysteins wird frisches EDTA oder heparinisieretes Plasma das frei von Hämolyse oder Trübung ist empfohlenen.. In Serumabscheidern gewonnenes Serum kann ebenfalls verwendet werden. Die Ergebnisse einzelner Patienten aus Serum, heparinisieretem Plasma und EDTA-Plasma sollten jedoch nur getrennt voneinander verwendet werden. Alle Proben sind unmittelbar nach der Gewinnung auf Eis zu lagern und so schnell wie möglich (innerhalb einer Stunde) zu zentrifugieren und zu separieren. Stark lipämische Proben sind ungeeignet. Proben können gut verschlossenen bei 2-8° C bis zu 48 Stunden, bzw. zur späteren Untersuchung bei -20° C gefroren gelagert werden⁶.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für die Anwendung als In-vitro-Diagnostikum

Sicherheitsmaßnahmen

1. Die in dieser Broschüre enthaltenen Anweisungen, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, sind genauestens zu befolgen.
2. Reagenzien R1 und R3 enthalten Natriumazid. Dieses kann mit Blei- oder Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Zur Vermeidung einer Azidansammlung bei der Entsorgung mit reichlich Wasser nachspülen
3. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile sind auf Anfrage bei Axis-Shield Diagnostics Ltd erhältlich.



Reagenz R1
Reagenz R3
Gesundheitsschädlich

R22: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

R32: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

S36/37/39: Geeignete Arbeitsschutzkleidung, Schutzhandschuhe und Augen-/Gesichtsschutz tragen.

S29/35: Nicht in die Kanalisation entleeren; diese Substanz und ihren Behälter auf sichere Weise entsorgen.

S46: Bei Verschlucken sofort einen Arzt aufsuchen und diesen Behälter oder das Etikett vorlegen.

VORBEREITUNG

Erforderliches, aber nicht mitgeliefertes Material

1. Entionisiertes Wasser.
2. Ein Analysengerät, das in der Lage ist, drei Reagenzien zu pipettieren, die Extinktion bei 340 nm zu messen und das über eine Temperaturregelung (37° C) verfügt.

ASSAYPROTOKOLL⁸

ERGEBNISSE

Ergebnisse werden vom Cobas MIRA in µmol/L ausgedruckt.

QUALITÄTSKONTROLLE

Es ist sicherzustellen, das angemessene Instandhaltung und Kalibrierung entsprechend der Herstelleranweisungen durchgeführt werden.

Untersuchte Vergleichssubstanzen mit Homocysteinwerten in normalen und abnormalen Bereichen sind zu prüfen, um die Leistung des Reagenz zu validieren. Der akzeptable Bereich der Kontrollgrenzen ist von den einzelnen Laboren zu bestimmen. Axis-Shield bietet einen Satz von niedrigen, mittleren und hohen Kontrollen an.

REF FHER200

Die Kontrollen enthalten L-Homocystein in aufbereitetem Humanserum mit den folgenden Konzentrationen:

Kontrolle	Mittelwert HCY (µmol/L)	Bereich HCY (µmol/L)
Kontrolle L	7,0	5,6 – 8,4
Kontrolle M	12,5	10,0 – 15,0
Kontrolle H	25,0	20,0 – 30,0

LEISTUNGSMERKMALE

(Unter Verwendung des Cobas MIRA)

Genauigkeit

Korrelationsstudien wurden mit frischem Plasma von Erwachsenen durchgeführt. Alle Proben wurden mit dem enzymatischen Assay, dem Abbott FPIA Assay und dem Pacific Biometrics, Inc. HPLC Assay analysiert. Aus den gewonnenen Daten ergaben sich folgende statistische Werte:

Vergleichsmethode	Abbott FPIA	HPLC
Anzahl von Proben	85	30
Steigung der Regressionsgeraden	0,964	1,059
Y-Achsenabschnitt	0,728	-0,035
Korrelationskoeffizient	0,993	0,989
Bereich ($\mu\text{mol/L}$)	4,6-51,8	5,1-26,0

Präzision

Präzisionsstudien wurden mit Hilfe des enzymatischen Homocysteinassays gemäß NCCLS-Dokument EP5-A⁷-Protokoll durchgeführt. Jede EDTA-Humanplasmaprobe wurde im Zweitnachweis in vierzig über 20 Tage verteilten Durchläufen untersucht. Die Ergebnisse sind nachstehend zusammengefasst:

Probe	Mittel ($\mu\text{mol/L}$)	Intra Assay CV%	Inter Assay CV%	Gesamt CV%
1	4,6	6,6	3,1	7,3
2	11,6	3,5	0,7	4,0
3	27,0	1,6	1,5	2,6

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des enzymatischen Homocysteinassays wurde mit 0,40 $\mu\text{mol/L}$ festgestellt.

Spezifität, Interferenz

Die Spezifität des Assays wurde für die in der nachstehenden Tabelle aufgeführten Störsubstanzen bewertet:

Störsubstanz	Konzentration der Störsubstanz	% Interferenz
Bilirubin	20 mg/dL	< 5%
Hämoglobin	1000 mg/dL	< 5%
Lipämie	1000 mg/dL	<10%
Glutathion	20 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Methionin	800 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Cystein	200 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Pyruvat	1000 $\mu\text{mol/L}$	< 5%

Im Assay führte keine dieser Substanzen zu erheblichen Störungen (<10%).

Zu durch Medikamente, Krankheit oder präanalytischen Variablen verursachten möglichen Störungen siehe Literaturverzeichnis (5, 6).

Verschleppung

In Studien zur Verschleppung wurde nachgewiesen, dass die Verschleppung unter der Sensitivität des Assays liegt.

ERWARTUNGSWERTE

Es wurde eine Studie mit Proben von 131 scheinbar gesunden Erwachsenen (59 Männer und 72 Frauen im Alter von 18 - 86 Jahren) durchgeführt. Die Plasmaproben (EDTA) wurden mit Hilfe des enzymatischen Homocysteinassays auf Gesamthomocystein untersucht. Bei dieser Methode ergab sich folgender Referenzbereich für das Homocystein:

Erwachsene 4,0-15,4 $\mu\text{mol/L}$

Diese Werte können als Richtlinie für der Erwartungswerte gelten. Jedem Labor wird empfohlen, einen Normalwertbereich für die von ihm versorgte Bevölkerung zu bestimmen.

ANWENDUNGSGRENZEN

1. Bei vorschriftsmäßiger Durchführung weist der enzymatische Homocysteinassay eine Linearität bis 50 µmol/L auf. Proben mit Werten über 50 µmol/L sind in Kochsalzlösung 1 zu 3 zu verdünnen und das Ergebnis ist mit drei zu multiplizieren (×3).
2. Das Reagenz R1 muss klar sein. Es ist zu verwerfen, wenn Trübung eintritt oder die Anfangsextinktion unter 0,700 liegt.
3. Cystathionin und Homocystein werden zusammen gemessen, aber bei der Allgemeinbevölkerung hat der Cystathionin-Spiegel (0,065 bis 0,3 µmol/l) keinen nennenswerten Effekt. In bestimmten Fällen kann der Cystathionin-Spiegel bei nierenkranken Patienten mit schweren Stoffwechselstörungen erhöht sein und zu einer Interferenz von mehr als 20 % führen. Auch wenn in einigen Studien beobachtet wurde, dass keine Patienten betroffen sind, haben andere Studien ergeben, dass dieser Effekt bei bis zu 10 % der nierenkranken Patienten auftreten kann.
4. **Medikamente, wie z. B. Methotraxat, Carbamazepin, Phenytoin, Distickstoffoxid oder 6-Azuridin-Triacetat, können die Homocysteinkonzentration in Plasma beeinflussen^{5,6}.**

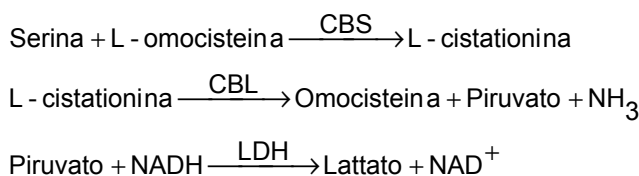
Il test enzimatico dell'Omocisteina serve per la determinazione quantitativa *in vitro* dell'omocisteina totale nel siero umano e nel sangue. Questo tipo di analisi è esclusivamente per uso professionale.

INTRODUZIONE



L'omocisteina (HCY) è un sottoprodotto del metabolismo delle proteine, o più esattamente di un aminoacido essenziale, la metionina. Di per sé non è contenuta nelle proteine ma viene ulteriormente scissa dagli enzimi in cisteina o viene convertita nuovamente in metionina. In piccole quantità, l'omocisteina non è dannosa per il corpo umano o per i vasi sanguigni ma, quando quantità eccessive si accumulano nel flusso sanguigno, le arterie possono essere danneggiate e l'infiammazione che ne risulta può eventualmente causare il blocco della circolazione del sangue al cuore. Gli studi clinici hanno avuto inizio nel 1969, quando il Dott. Kilmer S. McCully ha notato che i bambini nati con un difetto genetico del metabolismo che provoca alti livelli di omocisteina (omocistinuria) morivano per malattie cardiache avanzate in età molto prematura¹. Numerosi studi recenti, dimostrano che elevati livelli nel sangue di omocisteina hanno un valore predittivo per il rischio di danni alle arterie simili a quelli di elevato livello di colesterolo^{2,3}. Studi recenti hanno evidenziato che elevati livelli nel sangue di omocisteina determinano malformazioni e difetti alla nascita⁴.

PRINCIPIO DELL'ANALISI

L'omocisteina legata o in forma di dimero (forma ossidata) viene ridotta in omocisteina libera, che reagisce con la serina in una reazione catalizzata dalla cistationina beta-sintasi (CBS) per formare cistationina-L. La cistationina a sua volta viene scissa dalla cistationina beta-liasi (CBL) fino a formare l'omocisteina, il piruvato e l'ammoniaca. Il piruvato viene quindi convertito dalla lattato deidrogenasi (LDH) in lattato con NADH come coenzima. La velocità di conversione di NADH in NAD è direttamente proporzionale alla concentrazione di omocisteina (ΔA_{340} nm).



COMPONENTI DEL KIT

Reagente omocisteina enzimatica R1	liquido inodore trasparente	1 x 36ml in fiala color ambra	NADH (0.56mM), LDH (65KU/L), Serina (1.3mM), Trizma Base 1-10%, Trizma idrocloruro 1-10%, Azoturo di sodio <1%. Pronto per l'uso	
Reagente omocisteina enzimatica R2	liquido inodore trasparente	1 x 15ml in fiala trasparente	Riducente (TCEP; 25mM). Pronto per l'uso	
Reagente omocisteina enzimatica R3	Liquido inodore giallo paglierino	1 x 5ml in fiala color ambra	Enzimi di ciclo CBS (0.748KU/L) e CBL (16.4KU/L) Azoturo di sodio <1%. Pronto per l'uso	
Calibratore omocisteina enzimatica 1	liquido inodore trasparente	1 x 3ml in fiala trasparente (cappuccio blu)	omocisteina acquosa pura (0µmol/L). Pronto per l'uso	
Calibratore omocisteina enzimatica 2	liquido inodore trasparente	1 x 3ml in fiala trasparente (cappuccio rosso)	soluzione omocisteina acquosa (27µmol/L). Pronto per l'uso	

I calibratori sono preparati per via gravimetrica e sono riconducibili a una specifica procedura di misurazione (HPLC). I valori sono indicati sulle etichette (0 µmol/l e 27 µmol/l).

CONSERVAZIONE E REAGENTI

Conservazione e note procedurali

I reagenti di omocisteina enzimatica e i calibratori devono essere conservati in frigo alla temperatura di 2-8°C. **NON CONGELARE.** I reagenti e i calibratori rimangono inalterati se conservati in confezione integra fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. I reagenti rimangono stabili a bordo della strumentazione fino a 30 giorni. Non mescolare lotti diversi di reagenti.

Raccolta campioni e conservazione

Il campione consigliato per la misurazione di omocisteina è EDTA fresco o sangue eparinizzato privo di emolisi o torbidità. È possibile utilizzare inoltre il siero raccolto nelle apposite provette con separatore. Tuttavia, si sconsiglia di confrontare risultati di singoli pazienti ottenuti con il siero, il sangue eparinizzato o il sangue EDTA alternativamente. Tutti i campioni devono essere conservati nel ghiaccio immediatamente dopo il prelievo, centrifugati e separati dalle cellule non appena possibile (entro un'ora). Sono da scartare campioni fortemente lipemici. I campioni devono essere conservati tappati alla temperatura di 2-8°C per un massimo di 48 ore, o congelati a -20°C se il test viene eseguito in seguito⁶.

AVVISI E PRECAUZIONI

Solo per uso diagnostico in vitro Precauzioni di sicurezza

1. Rispettare rigorosamente le istruzioni nel foglietto illustrativo in particolare per le condizioni di uso e conservazione.
2. I reagenti R1 e R3 contengono azoturo di sodio che può reagire con tubature in piombo e rame formando azoturi di metallo altamente esplosivi. Per gettare i reagenti sciacquare con abbondanti quantità d'acqua per impedirne l'accumulo.
3. Le schede di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti nel kit sono disponibili su richiesta a Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Reagente R1
Reagente R3
Dannoso

R22: Dannoso in caso di ingestione.

R32: A contatto con acidi libera gas altamente tossico.

S36/37/39: Indossare abiti protettivi idonei, guanti e protezione per occhi/facciale.

S29/35: Non svuotare negli scarichi; gettare il materiale e i contenitori in modo corretto.

S46: In caso di ingestione, consultare immediatamente il medico illustrando il contenitore o l'etichetta

PREPARAZIONE

Materiali richiesti ma non in dotazione

1. Acqua deionizzata
2. Un analizzatore in grado di distribuire tre reagenti e di misurare l'assorbimento a 340nm con controllo della temperatura (37°C).

PROTOCOLLO ANALISI⁸

RISULTATI

I risultati sono espressi da Cobas MIRA in $\mu\text{mol/L}$.

CONTROLLO DI QUALITA'

Verificare l'esecuzione di manutenzione e calibratura adeguata secondo le istruzioni del produttore.

I materiali di controllo per analisi con valori di omocisteina in intervalli normali e anormali devono essere testati per convalidare le prestazioni del reagente. L'intervallo dei limiti di controllo accettabile deve essere stabilito dai singoli laboratori. Axis-Shield fornisce una serie di controlli bassi, medi e alti.

REF FHER200

I controlli contengono omocisteina L in siero umano nelle seguenti concentrazioni:

Controllo	Valore significativo di HCY ($\mu\text{mol/L}$)	Gamma HCY ($\mu\text{mol/L}$)
Controllo L	7.0	5.6 – 8.4
Controllo M	12.5	10.0 – 15.0
Controllo H	25.0	20.0 – 30.0

PRESTAZIONI DEL TEST

(stabiliti in base a Cobas MIRA)

Accuratezza

Studi di correlazione sono stati eseguiti con sangue fresco prelevato da individui adulti. Tutti i campioni sono stati analizzati utilizzando analisi enzimatica, Abbott FPIA e Pacific Biometrics, Inc HPLC assay. I dati ottenuti hanno determinato i seguenti valori statistici:

Metodo di confronto	Abbott FPIA	HPLC
Numero di campioni	85	30
Curva di linea di regressione	0.964	1.059
Intercetta Y	0.728	-0.035
Coefficiente di correlazione	0.993	0.989
Intervallo ($\mu\text{mol/L}$)	4.6-51.8	5.1-26.0

Precisione

Gli studi di precisione sono stati condotti utilizzando le analisi di omocisteina enzimatica secondo il protocollo EP5-A⁷ del documento NCCLS. Ogni campione di sangue EDTA umano è stato duplicato in quaranta cicli per 20 giorni. I risultati sono elencati di seguito:

Campione	Media ($\mu\text{mol/L}$)	Intraserie CV%	Interserie CV%	Totale CV%
1	4.6	6.6	3.1	7.3
2	11.6	3.5	0.7	4.0
3	27.0	1.6	1.5	2.6

Sensibilità analitica

La sensibilità analitica delle analisi di omocisteina enzimatica è stata riscontrata pari a 0.40 $\mu\text{mol/L}$.

Specificità analitica

La specificità delle analisi è stata stabilita per le sostanze interferenti elencate nella seguente tabella:

Sostanze di interferenza	Concentrazione delle sostanze interferenti	% Interferenza
Bilirubina	20 mg/dL	< 5%
Emoglobina	1000 mg/dL	< 5%
Lipaemia	1000 mg/dL	< 10%
Glutazione	20 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Metionina	800 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Cisteina	200 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Piruvato	1000 $\mu\text{mol/L}$	< 5%

Nessuna delle sostanze ha interferito in modo significativo nelle analisi (<10%).

Fare riferimento a (5,6) per possibili interferenze provocate da droghe, malattie o variabili preanalitiche.

Carryover

Studi di riporto mostrano che il carryover è inferiore alla sensibilità delle analisi.

VALORI ATTESI

È stato condotto uno studio con campioni prelevati da 131 adulti (59 uomini e 72 donne, in età compresa tra 18 e 86 anni) in buona salute. I campioni di sangue (EDTA) sono stati analizzati per omocisteina totale con il metodo enzimatico e l'intervallo di riferimento per l'omocisteina con questo metodo è:

Adulti 4.0-15.4 $\mu\text{mol/L}$

Questi valori devono essere considerati come linee guida per i valori attesi. Ogni laboratorio dovrà stabilire un intervallo di valori normali per la tipologia di persone loro pazienti.

LIMITAZIONI D'USO

1. La linearità del metodo enzimatico per l'omocisteina è pari a 50 $\mu\text{mol/L}$. I campioni con valori maggiori di 50 $\mu\text{mol/L}$ dovranno essere diluiti 1 a 3 in soluzione fisiologica e il risultato moltiplicato per tre ($\times 3$).
2. Il reagente R1 deve essere trasparente. Deve essere gettato se diventa torbido o se l'assorbimento iniziale è inferiore a 0.700.
3. La cistationina viene misurata con l'omocisteina, ma nella popolazione generale il livello di cistationina (da 0,065 a 0,3 $\mu\text{mol/l}$) ha un effetto trascurabile. I livelli di cistationina possono talvolta aumentare in pazienti nefropatici affetti da disturbi metabolici gravi, provocando interferenze superiori al 20%. Sebbene alcuni studi non abbiano riportato ripercussioni in nessuno dei pazienti esaminati, altri indicano un possibile effetto osservabile in fino al 10% dei pazienti nefropatici.
4. **Droghe quali: metrotexato, carbamazepina, fenotoina, protossido di azoto, o 6 azauridina triacetate possono influire sulla concentrazione nel sangue di omocisteina^{5,6}.**

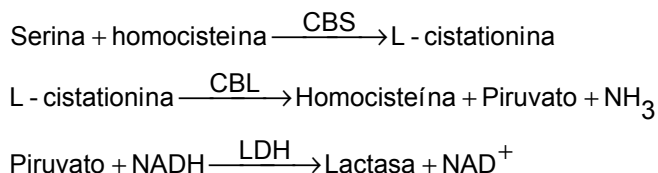
El Ensayo de homocisteína enzimática está indicado para la determinación cuantitativa *in vitro* del total de homocisteína en el suero y plasma humanos. Este ensayo es para uso profesional únicamente.

INTRODUCCIÓN



La homocisteína (HCY) es un producto derivado del metabolismo de la proteína, específicamente la descomposición del aminoácido esencial, la metionina. Por sí misma no está incorporada en las proteínas, pero se descompone en mayor grado por las enzimas para dar cisteína o convertirse de nuevo en metionina. En cantidades pequeñas la homocisteína no es dañina para el cuerpo o para los vasos sanguíneos, pero si se acumulan cantidades excesivas en el flujo sanguíneo es posible que se cause daño a los vasos arteriales, lo cual resulta en inflamación que finalmente puede causar el bloqueo de la sangre que entra en el corazón. Los estudios clínicos comenzaron en 1969, año en que el Dr. Kilmer S. McCully dio a conocer que hay niños nacidos con un error genético de metabolismo que causa elevados niveles de homocisteína (homocistinuria), lo que a su vez provoca su fallecimiento por enfermedades arteriales avanzadas a muy temprana edad¹. Los estudios más recientes demuestran que los niveles altos de homocisteína en la sangre tienen un valor predictivo del riesgo de contraer enfermedades arterio-coronarias que es similar al riesgo implícito en los niveles altos de colesterol^{2,3}. Los testimonios obtenidos recientemente indican también que los niveles elevados de homocisteína en la sangre son un factor en abortos y defectos de nacimiento⁴.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

La homocisteína ligada o dimerizada (forma oxidada) se reduce a homocisteína libre, que más tarde reacciona con serina catalizada mediante la cistationina de beta-sintasa (CBS) para formar L-cistationina. A su vez la cistationina se descompone por cistationina beta-liasa (CBL) para dar homocisteína, piruvato y amoniaco. El piruvato se convierte entonces por lactato deshidrogenasa (LDH) en lactasa con NADH como coenzima. La tasa de conversión NADH en NAD es directamente proporcional a la concentración de homocisteína (ΔA_{340} nm).



COMPONENTES DEL KIT

Homocisteína enzimática reactivo R1	Líquido transparente inodoro	1 x 36ml en vial de color ámbar	NADH(0.56mM), LDH (65KU/L), Serina (1.3mM), Base de Trizma 1-10%, Hidrocloruro de Trizma 1-10%, Azida sódica <1%. Listo para su uso	
Homocisteína enzimática reactivo R2	Líquido transparente inodoro	1 x 15ml en vial transparente	Reductor (TCEP;25mM). Listo para su uso	
Homocisteína enzimática reactivo R3	Líquido inodoro de color Amarillo	1 x 5ml en vial color ámbar	Enzimas cíclicas CBS (0.748KU/L) y CBL (16.4KU/L) Azida sódica <1%. Listo para su uso	
Homocisteína enzimática Calibrador 1	Líquido transparente inodoro	1 x 3ml en vial transparente (tapón azul)	Blanco acuoso de homocisteína (0µmol/L). Listo para su uso	
Homocisteína enzimática Calibrador 2	Líquido transparente inodoro	1 x 3ml en vial transparente (Tapón Rojo)	Solución acuosa de homocisteína (27µmol/L). Listo para su uso	

Los calibradores se preparan gravimétricamente y son trazables a un procedimiento de medición designado (HPLC). Los valores se imprimen en las etiquetas (0 µmol/l y 27 µmol/l).

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Notas sobre procedimiento y manejo

Los Reactivos de Homocisteína Enzimática y los Calibradores deben ser almacenados a una temperatura de 2-8°C. **NO SE DEBE CONGELAR.** Los reactivos y calibradores permanecen estables cuando se almacenan tal como son suministrados y hasta las fechas de caducidad que figuran en las etiquetas. Los reactivos permanecen estables a bordo del instrumento hasta un máximo de 30 días. No se deben mezclar lotes diversos de reactivos.

Recogida y manejo de muestras

El plasma fresco con EDTA o heparinizado libre de hemólisis o turbidez, es la muestra recomendada para la medición de la homocisteína. También se puede usar el suero recogido en probetas separadoras del suero. Pero no se recomienda el uso intercambiable de resultados del suero de pacientes individuales, el plasma heparinizado y el plasma EDTA. Todas las muestras deben ser colocadas en hielo inmediatamente después de ser tomadas, y deben ser centrifugadas con separación de células tan pronto como sea posible (antes de que transcurra una hora). Las muestras severamente lipémicas no son satisfactorias. Las muestras deben ser almacenadas con tapa hermética a una temperatura de 2-8°C durante un máximo de 48 horas, o bien congeladas a -20°C si se va a demorar el sometimiento a pruebas⁶.

AVISOS Y PRECAUCIONES

Para uso diagnóstico in vitro únicamente *Precauciones de seguridad*

1. Es necesario ceñirse estrictamente a las instrucciones que se incluyen en este folleto, en especial por lo que se refiere a las condiciones de manejo y almacenamiento.
2. Los reactivos R1 y R3 contienen azida sódica que puede reaccionar en contacto con el plomo o el cobre de las tuberías formando azidas de metal altamente explosivas. Al desecharlos se debe dejar correr agua abundante para impedir la acumulación de azidas.
3. Las fichas de datos de seguridad para todos los componentes peligrosos incluidos en este kit se pueden conseguir solicitándolas a Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Reactivo R1
Reactivo R3
Nocivos

R22: Nocivo si se ingiere.

R32: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.

S36/37/39: Se debe hacer uso de ropajes protectores, guantes y protección de cara y ojos.

S29/35: No se debe desechar en las alcantarillas; es necesario desechar este material y su envase de un modo seguro.

S46: Si es ingerido, se debe acudir en seguida al médico, mostrándole este envase o la etiqueta.

PREPARACIÓN

Materiales necesarios pero no suministrados

1. Agua desionizada.
2. Un analizador capaz de dispensar tres reactivos y de medir la absorbancia a 340nm con control de temperatura (37°C).

PROTOCOLO DEL ENSAYO⁸

RESULTADOS

Los resultados han sido impresos por el Cobas MIRA en µmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es necesario asegurarse de que el apropiado mantenimiento y calibración se llevan a cabo en conformidad con las instrucciones del fabricante.

Los materiales de control del ensayo con valores para la homocisteína tanto en el rango normal como en el anormal se deben someter a tests para validar el rendimiento del reactivo. El rango de límites aceptables de control debe ser determinado por cada laboratorio de forma individual. Axis-Shield facilita un conjunto de controles de tipo bajo, medio y alto.

REF FHER200

Los controles contienen L-homocisteína en suero humano procesado en las siguientes concentraciones:

<i>Control</i>	<i>Valor promedio HCY ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>Rango HCY ($\mu\text{mol/L}$)</i>
<i>Control bajo</i>	7.0	5.6 – 8.4
<i>Control medio</i>	12.5	10.0 – 15.0
<i>Control alto</i>	25.0	20.0 – 30.0

DATOS DE FUNCIONAMIENTO

(Establecido en el Cobas MIRA)

Exactitud

Se realizaron estudios de correlación con plasma fresco de adultos. Fueron analizadas todas las muestras utilizando el ensayo enzimático Abbott FPIA y el ensayo HPLC Pacific Biometrics, Inc. Los datos obtenidos dieron los siguientes valores estadísticos:

<i>Método de comparación</i>	<i>Abbott FPIA</i>	<i>HPLC</i>
<i>Número de muestras</i>	85	30
<i>Declive de la línea de regresión</i>	0.964	1.059
<i>Corte en Y</i>	0.728	-0.035
<i>Coefficiente de correlación</i>	0.993	0.989
<i>Rango ($\mu\text{mol/L}$)</i>	4.6-51.8	5.1-26.0

Precisión

Se realizaron estudios de precisión utilizando el ensayo de homocisteína enzimática que se atiene al protocolo del documento NCCLS EP5-A⁷, haciendo la duplicación de la muestra de cada plasma humano EDTA, con cuarenta series en 20 días. Los resultados se resumen a continuación:

<i>Muestra</i>	<i>Promedio ($\mu\text{mol/L}$)</i>	<i>Intra-serie CV%</i>	<i>Inter-serie CV%</i>	<i>Total CV%</i>
1	4.6	6.6	3.1	7.3
2	11.6	3.5	0.7	4.0
3	27.0	1.6	1.5	2.6

Sensibilidad analítica

Se comprobó que la sensibilidad analítica del ensayo de homocisteína enzimática era de 0.40 $\mu\text{mol/L}$.

Especificidad analítica

La especificidad del ensayo fue valorada con respecto a las sustancias interferentes que figuran en la siguiente tabla:

<i>Sustancia interferente</i>	<i>Concentración de sustancia interferente</i>	<i>% Interferencia</i>
<i>Bilirrubina</i>	20 mg/dL	< 5%
<i>Hemoglobina</i>	1000 mg/dL	< 5%
<i>Lipemia</i>	1000 mg/dL	< 10%
<i>Glutación</i>	20 µmol/L	< 5%
<i>Metionina</i>	800 µmol/L	< 5%
<i>Cisteína</i>	200 µmol/L	< 5%
<i>Piruvato</i>	1000 µmol/L	< 5%

Ninguna de estas sustancias interfirió de modo significativo (<10%) en el ensayo.

Se deben consultar las referencias (5, 6) para comprobar las posibles interferencias causadas por fármacos, enfermedades o variables preanalíticas

Arrastre

Los estudios del arrastre han mostrado que el arrastre es menor que la sensibilidad del ensayo.

VALORES ESPERADOS

Se llevó a cabo un estudio utilizando muestras de 131 adultos (59 hombres y 72 mujeres, de edades 18-86) que parecían estar sanos. Fueron sometidas a ensayos muestras de plasma (EDTA) con respecto al total de homocisteína mediante el ensayo de homocisteína enzimática. El rango de referencia para la homocisteína mediante este método es:

Adultos 4.0-15.4

Estos valores deben ser considerados como orientación en relación con los valores esperados. Se recomienda que cada laboratorio determine un rango de valores normales para la población a la que atiende.

LIMITACIONES DEL USO

1. La linealidad del ensayo de homocisteína enzimática si se lleva a cabo siguiendo las recomendaciones es de 50 µmol/L. Las muestras con valores superiores a 50 µmol/L deben ser diluidas en proporción de 1 a 3 en solución salina, multiplicando por tres el resultado (×3).
2. El reactivo R1 debe ser transparente. Debe ser desechado si se vuelve turbio o si la absorbancia inicial es de menos de 0,700.
3. La cistationina se determina con la homocisteína, pero en la población general, el nivel de cistationina (de 0,065 a 0,3 µmol/l) tiene un efecto insignificante. En algunas ocasiones, los niveles de cistationina pueden aumentar en los enfermos renales con trastornos metabólicos graves y provocar una interferencia superior al 20%. Aunque en algunos estudios se ha demostrado que ningún paciente estaba afectado, en otros se ha puesto de manifiesto que este efecto podría observarse hasta en un 10% de los enfermos renales.
4. **Los fármacos como metotrexato, carbamazepina, fentoína, óxido nitroso, o triacetato de azauridina 6 pueden afectar la concentración de homocisteína en el plasma** ^{5,6}.

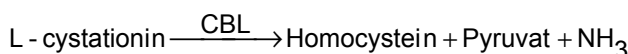
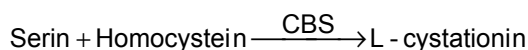
Enzymatisk homocysteinanalys är avsedd för *in vitro* kvantitativ bestämning av total homocystein i humanserum och plasma. Denna analys är endast för professionellt bruk.

INLEDNING



Homocystein (HCY) är en biprodukt vid proteinmetabolism, specifikt nedbrytning av den essentiella aminosyran, metionin. Det ingår inte av sig själv i proteinerna utan bryts ned vidare av enzymer till cystein eller omvandlas tillbaka till metionin. I små mängder är homocystein inte skadligt för kroppen eller blodkärlen, men i överskottsmängder som ackumuleras i blodströmmen kan artärer skadas och den resulterande inflammationen kan orsaka blockering av blodet till hjärtat. Kliniska studier började under 1969, när Dr. Kilmer S. McCully rapporterade att barn födda med ett genetiskt metabolismfel som orsakar förhöjda homocysteinvärden (homocysteinuri) dog med långt framskriden artärsjukdom vid mycket ung ålder¹. Senare studier har visat att förhöjda blodnivåer med homocystein har ett förutsebart värde för hjärtkärlsjukdom liknande den med förhöjda kolesterolnivåer^{2,3}. Nyligen har det visats att förhöjda blodnivåer av homocystein kan sammankopplas med missfall och fosterdefekter⁴.

ANALYSPRINCIP

Bunden eller dimeriserad homocystein (oxiderad form) reduceras till fritt homocystein, som sedan reagerar med serin katalyserat med cystationinbeta-syntas (CBS) och bildar L-cystationin. Cystationin i sin tur bryts ner av cystationinbeta-lyas (CBL) och bildar homocystein, pyruvat och ammoniak. Pyruvat omvandlas sedan av laktatdehydrogenas (LDH) till laktat med NADH som coenzym. NADH-omvandlingshastigheten till NAD är direkt proportionell mot koncentrationen av homocystein (ΔA_{340} nm).



SATSKOMPONENTER

Enzymatisk homocysteinreagens R1	Klar, luktfri vätska	1 x 36ml i bärnstensfärgad flaska	NADH (0.56mM), LDH (65KU/L), serin (1.3mM), trizmabas 1-10 %, trizmaväteklorid 1-10 %, Natriumazid <1 %. Bruksfärdig	
Enzymatisk homocysteinreagens R2	Klar, luktfri vätska	1 x 15 ml i ofärgad flaska	Reduktant (TCEP;25mM). Bruksfärdig	
Enzymatisk homocysteinreagens R3	Blekgul, luktfri vätska	1 x 5 ml i bärnstensfärgad flaska	Stegenzymerna CBS (0.748KU/L) och CBL (16.4KU/L) Natriumazid <1 %. Bruksfärdig	
Enzymatisk homocystein kalibrator 1	Klar, luktfri vätska	1 x 3 ml i ofärgad flaska (blått lock)	Vattinig homocysteinblank (0µmol/L). Bruksfärdig	
Enzymatisk homocystein kalibrator 2	Klar, luktfri vätska	1 x 3 ml i ofärgad flaska (rött lock)	Vattinig homocysteinlösning (27µmol/L). Bruksfärdig	

Kalibratorerna är preparerade gravimetriskt och är spårbara till en betecknad mätprocedur (HPLC). Värdena står tryckta på etiketterna (0 µmol/l och 27 µmol/l).

FÖRVARING AV REGENSER

Hanterings- och metodanvisningar

De enzymatiska homocysteinreagenserna och kalibratorerna skall förvaras i kylskåp vid 2-8 °C. FÅR EJ FRYNAS. Reagenserna och Kalibratorerna är stabila vid förvaring som de levereras tills utgångsdatum på etiketterna. Reagenserna är stabila i instrumenten i upp till 30 dagar. Blanda inte olika reagenssatser.

Provinsamling och hantering.

Nytaget EDTA eller hepariniserad plasma fri från hemolys eller turbiditet är det rekommenderade provet för mätning av homocystein. Serum insamlat i serumseparatorrör kan också användas. Det rekommenderas dock inte att använda individuella patientresultat från omväxlande serum, hepariniserat plasma eller EDTA-plasma. Alla prov måste placeras omgående på is efter provtagning och skall centrifugeras och separeras från celler så snart som möjligt (inom 1 timma). Kraftigt lipemiska prov är otillfredsställande. Prov skall förvaras tätt förslutna vid 2-8 °C i upp till 48 timmar eller frysta vid -20 °C om testningen fördröjs⁶.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Endast för in vitro diagnostik

Säkerhetsföreskrifter

1. Följ strikt anvisningarna i detta häfte särskilt vad gäller hanterings- och lagringsvillkor.
2. Reagenserna R1 och R3 innehåller natriumazid som kan reagera med bly- eller kopparrör och bilda högexplosiva metallazider. Skölj med stora mängder vatten när det kastas bort så att inte metallazider ackumuleras
3. Materialsäkerhetsdatablad för alla farliga komponenter i denna sats finns tillgängliga på begäran från Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Reagens R1
Reagens R3
Skadlig

R22: Farligt vid förtäring.

R32: Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.

S36/37/39: Använd lämpliga skyddskläder, skyddshandskar och skyddsglasögon eller ansiktsskydd.

S29/35: Töm ej i avloppet, produkt och förpackning skall oskadliggöras på säkert sätt.

S46: Vid förtäring kontakta genast läkare och visa denna förpackning eller etikett.

FÖRBEREDELSE

Material som behövs men inte medföljer

1. Avjoniserat vatten.
2. En analysator som kan dispensera tre reagenser och mäta absorbansen vid 340 nm med temperaturkontroll (37°C).

ANALYSPROTOKOLL⁸

RESULTAT

Resultaten skrivs ut på Cobas MIRA i µmol/L.

KVALITETSKONTROLL

Kontrollera att adekvat underhåll och kalibrering utförs i enlighet med tillverkarens anvisningar.

Analyserat kontrollmaterial med värden för homocystein i både normala och onormala intervall måste testas för att godkänna reagensresultaten. Acceptabla kontrollintervaller skall etableras av enskilda laboratorier. Axis-Shield levererar en uppsättning låga, medel och höga kontroller.

REF FHER200

Kontrollerna innehåller L-homocystein i processat humanserum vid följande koncentrationer:

Kontroll	Medelvärde HCY (µmol/L)	Intervall HCY (µmol/L)
Kontroll L	7,0	5,6 – 8,4
Kontroll M	12,5	10,0 – 15,0
Kontroll H	25,0	20,0 – 30,0

RESULTATDATA

(Etablerade på Cobas MIRA)

Noggrannhet

Korrelationsstudier utfördes med nytagen plasma från vuxna. Alla proven analyserades med den enzymatiska analysen, Abbott FPIA analysen och Pacific Biometrics, Inc. HPLC-analysen. De erhållna data gav följande statistiska värden:

Jämförelsemetod	Abbott FPIA	HPLC
Antal prov	85	30
Regressionslinjens lutning	0,964	1,059
Y-axelns skärning	0,728	-0,035
Korrelationskoefficient	0,993	0,989
Intervall ($\mu\text{mol/L}$)	4,6-51,8	5,1-26,0

Precision

Precisionsstudier genomfördes med utnyttjande av den enzymatiska homocysteinanalysen enligt NCCLS-dokumentet EP5-A⁷-protokoll. Alla humana EDTA plasmaprover kördes i duplikat i fyrtio körningar spridda över 20 dagar. Resultaten sammanfattas nedan:

Prov	Medelvärde ($\mu\text{mol/L}$)	Inom körning CV %	Mellan körning CV %	Totalt CV %
1	4,6	6,6	3,1	7,3
2	11,6	3,5	0,7	4,0
3	27,0	1,6	1,5	2,6

Analytisk sensitivitet

Den analytiska sensitiviteten hos den enzymatiska homocysteinanalysen befanns vara 0,40 $\mu\text{mol/L}$.

Analytisk specificitet

Analysens specificitet utvärderades för de störande ämnen uppräknade i tabellen nedan:

Störande ämne	Störande ämnens koncentration	% störning
Bilirubin	20 mg/dL	< 5 %
Hemoglobin	1000 mg/dL	< 5 %
Lipemi	1000 mg/dL	< 10 %
Glutation	20 $\mu\text{mol/L}$	< 5 %
Metionin	800 $\mu\text{mol/L}$	< 5 %
Cystein	200 $\mu\text{mol/L}$	< 5 %
Pyruvat	1000 $\mu\text{mol/L}$	< 5 %

Inget av dessa ämnen störde signifikant (<10 %) i analysen.

Se referenserna (5,6) för möjliga störningar orsakade av drogen, sjukdom eller föranalytiska variabler.

Smittoöverföring

Studier av smittoöverföring visar att smittoöverföring är mindre än analysens sensitivitet.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

En studie genomfördes med prov från 131 vuxna (59 män och 72 kvinnor, i åldrarna 18-86 år) som föreföll friska. Plasma (EDTA)-prover analyserades för total homocystein med den enzymatiska homocysteinanalysen och referensintervallet för homocystein med denna metod är:

Vuxna 4,0-15,4 µmol/L

Dessa värden anses vara riktlinjer för förväntade värden. Varje laboratorium uppmuntras att etablera ett intervall med normalvärden för den population som de hanterar.

BEGRÄNSNINGAR I ANVÄNDNINGEN

1. Linjäriteten hos den enzymatiska homocysteinanalysen när den körs enligt anvisning är 50 µmol/L. Prov med värden högre än 50 µmol/L skall spädas 1 till 3 i saltlösning och resultatet multipliceras med tre (x3).
2. R1-reagenset skall vara klart. Det skall kasseras om det blir grumligt eller om den initiala absorbansen är mindre än 0,700.
3. Cystationin mäts med homocystein, men hos befolkningen i allmänhet har cystationinnivån (0,065 till 0,300 µmol/l) en försumbar effekt. I vissa fall kan nivåerna av cystationin stiga hos njursjuka patienter med svåra metaboliska störningar och ge upphov till mer än 20 % interferens. Även om vissa studier har visat att inga patienter påverkas, så har andra visat att denna effekt kan ses hos upp till 10 % av patienter med njursjukdom.
4. **Droger som metotrexat, karbamazepin, fenytoin, kväveoxid, eller 6 azauridine triacetat kan påverka plasmats homocysteinkoncentration^{5,6}.**

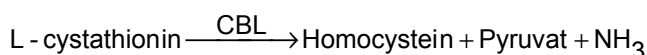
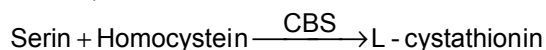
Den enzymatiske homocysteinanalyse er beregnet til *in vitro* kvantitativ bestemmelse af total homocystein i humant serum eller plasma. Denne analyse er kun til professionelt brug.

INDLEDNING



Homocystein (HCY) er et biprodukt af proteinmetabolismen, specifikt fra nedbrydning af den livsnødvendige aminosyre, metionin. Det optages ikke selv i proteiner, men nedbrydes yderligere af enzymer til cystein eller omdannes igen til metionin. Homocystein er ikke skadeligt for krop og blodkar i små mængder, men hvis store mængder ophobes i blodet, kan blodkar blive beskadiget og den efterfølgende inflammation kan muligvis forårsage blokering af blod til hjertet. Kliniske undersøgelser begyndte i 1969, hvor Dr. Kilmer S. McCully rapporterede, at børn født med en genetisk stofskiftedefekt, der medfører et forhøjet homocysteinniveau (homocystinuri), døde med fremskredne arteriesygdomme i en meget ung alder¹. Senere undersøgelser tyder på, at forhøjede niveauer af homocystein i blodet har en prædikativ værdi for risiko for sygdom i kranspulsåren på samme måde som forhøjede kolesterolniveauer^{2,3}. Nyere dokumentation har også knyttet forhøjede homocysteinniveauer i blodet til spontan abort og fødselsdefekter⁴.

ANALYSEPRINCIP

Bundet eller dimeriseret homocystein (oxideret form) reduceres til fri homocystein, som derefter reagerer med serin katalyseret af cystathionin beta-syntase (CBS) og danner L-cystathionin. Cystathionin nedbrydes derefter af cystathionin beta-lyase (CBL) og danner homocystein, pyruvat og ammoniak. Pyruvat konverteres derefter af laktat dehydrogenase (LDH) til laktat med NADH som coenzym. Hastigheden for NADH-konverteringen til NAD er direkte proportional med homocysteinkoncentrationen (ΔA_{340} nm).



KOMPONENTER I KITTET

Enzymatisk homocystein reagens R1	Klar lugtfri væske	1 x 36ml i et orange glas	NADH (0.56mM), LDH (65KU/L), Serin (1.3mM), Trizma Base 1-10%, Trizma Hydrochlorid 1-10%, Natriumazid <1%. Brugsklart.	
Enzymatisk homocystein reagens R2	Klar lugtfri væske	1 x 15ml i et ufarvet glas	Reduktant (TCEP;25mM). Brugsklart.	
Enzymatisk homocystein reagens R3	Svagt gul lugtfri væske	1 x 5ml i et orange glas	Cyklus-enzym CBS (0.748KU/L) og CBL (16.4KU/L) Natriumazid <1%. Brugsklart.	
Enzymatisk homocystein kalibrator 1	Klar lugtfri væske	1 x 3ml i et ufarvet glas (blåt låg)	Vandig homocystein blind (0µmol/L). Brugsklart.	
Enzymatisk homocystein kalibrator 2	Klar lugtfri væske	1 x 3ml i et ufarvet glas (rødt låg)	Vandig homocystein-opløsning (27µmol/L). Brugsklart.	

Kalibratorerne er klargjort gravimetrisk og kan spores til en specificeret målemetode (HPLC). Værdierne er trykt på mærkaterne (0 µmol/l og 27 µmol/l).

OPBEVARING AF REAGENSER

Vejledning om håndtering og procedurer

De enzymatiske homocysteinreagenser og kallibratorer bør opbevares køligt ved 2-8 °C. **MÅ IKKE NEDFRYSES.** Såfremt reagenser og kalibratorer opbevares uåbnet i originalemballagen, er til holdbare indtil udløbsdatoen angivet på etiketterne. Reagenserne er holdbare i op til 30 dage på instrumentet. Bland ikke reagenser med forskellige lotnumre.

Prøvetagning og håndtering

Frisk EDTA- eller hepariniseret plasma uden hæmolyse eller uklarerheder anbefales som prøvemateriale til måling af homocystein. Serum, der er opsamlet i gel glas, kan også bruges. Det frarådes dog at blande individuelle patientresultater fra serum, hepariniseret plasma og EDTA plasma. Alle prøver skal lægges på is lige efter prøvetagningen og skal centrifugeres og separeres fra cellerne hurtigst muligt (inden for en time). Stærkt lipæmiske prøver bør ikke bruges. Prøverne kan opbevares tæt tillukket ved 2-8°C i op til 48 timer eller fryses ved -20°C, hvis testningen forsinkes⁶.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

Kun til in vitro-diagnostisk brug.

Sikkerhedsforanstaltninger

1. Følg nøje instrukserne i denne indlægsseddel, specielt angående håndtering og opbevaringsforhold.
2. Reagens R1 og R3 indeholder natriumazid, der kan reagere med bly- og kobber og derved danne yderst eksplosive metalazider. Ved bortskaffelse skylles med store mængder vand for at undgå azidophobning.
3. Sikkerhedsdatablade til alle farlige komponenter i dette kit kan rekvireres fra Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Reagens R1
Reagens R3
Sundhedsskadelig

R22: Farlig ved indtagelse.

R32: Udvikler meget giftig gas ved kontakt med syre.

S36/37/39: Brug særligt arbejdstøj, egnede beskyttelseshandsker og -briller/ansigtsskærm.

S29/35: Må ikke tømmes i kloak afløb; materialet og dets beholder skal bortskaffes på en sikker måde.

S46: Ved indtagelse, kontakt omgående læge og vis denne beholder eller etiket.

FORBEREDELSE

Nødvendige materialer, der ikke medfølger

1. Deioniseret vand.
2. En analysator, der kan dispensere tre reagenser og måle absorption ved 340nm med temperaturkontrol (37°C).

ANALYSEPROTOKOL⁸

RESULTATER

Resultater udskrives af Cobas MIRA i µmol/L.

KVALITETSKONTROL

Sørg for at tilstrækkelig vedligeholdelse og kalibrering udføres i henhold til fabrikantens vejledning.

Kontrolmaterialer med forventede analyseværdier for homocystein i både det normale og unormale område bør testes for at validere reagensets ydeevne. Acceptable kontrolintervaller bør fastsættes af det enkelte laboratorium. Axis-Shield kan levere et sæt med lav, medium og høj kontrol.

REF FHER200

Kontrollerne indeholder L-homocystein i behandlet humant serum i de følgende koncentrationer:

Kontrol	Middelværdi HCY (µmol/L)	Område HCY (µmol/L)
Kontrol L	7,0	5,6 – 8,4
Kontrol M	12,5	10,0 – 15,0
Kontrol H	25,0	20,0 – 30,0

DATA FOR YDEEVNEN

(Fastsat på Cobas MIRA)

Nøjagtighed

Korrelationsstudier blev udført med frisk plasma fra voksne. Alle prøver blev analyseret med den enzymatiske analyse, Abbott FPIA assay og HPLC assay fra Pacific Biometrics, Inc. De opnåede data gav følgende statistiske værdier:

Sammenligningsmetode	Abbott FPIA	HPLC
Antal prøver	85	30
Regressionsliniens hældning	0,964	1,059
Y-skæringspunkt	0,728	-0,035
Korrelationskoefficient	0,993	0,989
Område ($\mu\text{mol/L}$)	4,6-51,8	5,1-26,0

Præcision

Præcisionsstudier blev udført ved at bruge den enzymatisk homocystein analyse i henhold til protokollen i NCCLS dokumentet EP5-A⁷. Hver human EDTA-plasmaprøve blev analyseret med dobbeltbestemmelse i fyrré kørsler over 20 dage. Resultaterne er opsummeret nedenfor:

Prøve	Gennemsnit ($\mu\text{mol/L}$)	Indenfor kørsler CV%	Mellem kørsler CV%	Total CV%
1	4,6	6,6	3,1	7,3
2	11,6	3,5	0,7	4,0
3	27,0	1,6	1,5	2,6

Analytisk sensitivitet

Den analytiske sensitivitet for den enzymatiske homocystein analyse blev fundet at være 0,40 $\mu\text{mol/L}$.

Analytisk specificitet

Analysens specificitet blev vurderet for nedenstående interfererende stoffer:

Interfererende stof	Koncentration af interfererende stof	% Interferens
Bilirubin	20 mg/dL	< 5%
Hæmoglobin	1000 mg/dL	< 5%
Lipider	1000 mg/dL	< 10%
Glutathion	20 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Metionin	800 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Cystein	200 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Pyruvat	1000 $\mu\text{mol/L}$	< 5%

Ingen af disse stoffer interfererede væsentligt (<10%) med analysen.

Se referencer (5,6) for mulig interferens, der skyldes medicin, sygdom eller præanalytiske variable

Carry-over effekt

Studier af carry-over effekt viser, at carry-over er mindre end analysens sensitivitet.

FORVENTEDE VÆRDIER

Et studie blev udført med prøver fra 131 voksne (59 mænd og 72 kvinder i alderen 18-86), som tilsyneladende var raske. Plasma (EDTA) prøver blev analyseret for total homocystein med den enzymatiske homocystein analyse, og referenceområdet for homocystein ved denne metode er:

Voksne 4,0-15,4 $\mu\text{mol/L}$

Disse værdier skal betragtes som vejledende for de forventede værdier. Det anbefales, at hvert laboratorium fastsætter et område med normalværdier for den lokale population.

BEGRÆNSNINGER VED ANVENDELSE

1. Når den enzymatiske homocystein analyse køres som angivet er lineariteten 50 $\mu\text{mol/L}$. Prøver med værdier over 50 $\mu\text{mol/L}$ bør fortyndes i forholdet 1:3 i saltvand, og resultatet skal derefter multipliceres med tre ($\times 3$).
2. R1 reagenset skal være klar. Det skal kasseres, hvis det bliver uklart, eller hvis den initiale absorption er under 0,700.
3. Cystathionin måles med homocystein, men hos den almene befolkning har cystathioninniveauet (0,065 til 0,3 $\mu\text{mol/l}$) en ubetydelig effekt. I nogle tilfælde kan cystathioninniveauerne stige hos nyrepatienter med svære stofskifteforstyrrelser og medføre mere end 20 % interferens. Skønt nogle undersøgelser har vist, at patienterne ikke får nogen påvirkning, har andre vist, at denne effekt kan ses hos op til 10 % af nyrepatienterne.
4. **Lægemidler som for eksempel methotrexat, carbamazepin, phenytoin, dinitrogenoxid og 6-azauridintriacetat kan påvirke koncentrationen af homocystein i plasma^{5,6}.**

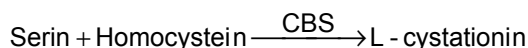
Test na enzymatický homocystein má za cíl stanovení *in vitro* celkového homocysteinu v lidském séru a plazmě. Tento test slouží pouze k odbornému použití

ÚVOD



Homocystein (HCY) je vedlejším produktem metabolismu bílkovin, přesněji rozpadu esenciální aminokyseliny, metioninu. Ten není sám o sobě zařazen do bílkovin, je však dále štěpen enzymy na cystein nebo se mění zpět na metionin. V malých množstvích není pro lidské tělo a pro krevní cévy škodlivý, když se však v krevním řečišti nakumuluje v nadbytečném množství, může dojít k poškození tepen a výsledný zánět může nakonec vést k zablokování průchodu krve do srdce. Klinické studie byly zahájeny v roce 1969, kdy Dr. Kilmer S. McCully podal zprávu, že děti narozené s genetickou poruchou metabolismu, která způsobuje zvýšené hladiny homocysteinu (homocystinurii), zemřely ve velmi nízkém věku na pokročilé arteriální onemocnění¹. Novější studie přinášejí doklady o tom, že zvýšené hladiny homocysteinu mají prediktivní hodnotu co se týče nebezpečí onemocnění věnčitých tepen, podobně jako při zvýšených hladinách cholesterolu^{2,3}. Nové doklady rovněž uvádějí zvýšené hladiny homocysteinu v krvi u spontánních potratů a při porodních poruchách⁴.

PRINCIP TESTU

Vázaný nebo dimerizovaný homocystein (v oxidované formě) je redukován na volný homocystein, který potom reaguje se serinem katalyzovaným cystationin beta-syntézou (CBS), aby vytvořil L-cystationin. Cystationin je zase štěpen cystationin beta-lyázou (CBL), aby vytvořil homocystein, pyruvát a amoniak. Pyruvát je potom přeměněn laktátdehydrogenázou (LDH) na laktát s NADH jako koenzymem. Míra přeměny NADH na NAD je přímo úměrná koncentraci homocysteinu (ΔA_{340} nm).



SOUČÁSTI KITU

Reagencie R1 pro enzymatický homocystein	Čirá tekutina bez zápachu	1 x 36ml v neprůhledné lékovce	NADH (0,56mM), LDH (65KU/L), Serin (1,3mM), Trizma Base 1-10%, Trizma hydrochlorid 1-10 %, Azid sodný <1%. Připraven k upotřebení.	Xn 
Reagencie R2 pro enzymatický homocystein	Čirá tekutina bez zápachu	1 x 15ml v čiré lékovce	Redukční činidlo (TCEP;25mM). Připraven k upotřebení.	
Reagencie R3 pro enzymatický homocystein	Bledě žlutá tekutina bez zápachu	1 x 5ml v neprůhledné lékovce	cyklující enzymy CBS (0,748 KU/L) a CBL (16,4KU/L) Azid sodný <1%. Připraven k upotřebení.	Xn 
Kalibrátor pro enzymatický homocystein 1	Čirá tekutina bez zápachu	1 x 3ml v čiré lékovce (modré víčko)	Vodný homocystein blank (0 μ mol/L). Připraven k upotřebení.	
Kalibrátor pro enzymatický homocystein 2	Čirá tekutina bez zápachu	1 x 3ml v čiré lékovce (červené víčko)	Vodný roztok homocysteinu (27 μ mol/L). Připraven k upotřebení.	

Kalibrátory jsou připraveny gravimetricky a jsou odvoditelné od stanoveného postupu měření (HPLC). Hodnoty jsou vylíčeny na štítcích (0 μ mol/L a 27 μ mol/L).

SKLADOVÁNÍ REAGENCIÍ

Poznámky k manipulaci a k postupu

Reagencia a kalibrátory pro enzymatický homocystein musejí být skladovány zchladené na teplotu 2-8°C. **NEZMRAŽOVAT.** Reagencie a kalibrátory jsou stabilní, jsou-li skladovány tak jak byly dodány až do data expirace uvedeného na štítcích. Reagencie jsou stabilní v přístrojích až po dobu 30 dní. Nemíchejte spolu různé šarže reagensů.

Sběr a skladování vzorků

Doporučovaný vzorek pro měření homocysteinu je čerstvá EDTA (etyléndiamintetraoctová kyselina) nebo heparizovaná plazma bez hemolýzy a zakalení. Rovněž je možno použít sérum odebrané do zkumavek odlučovače séra. Nedoporučuje se však vzájemně zaměňovat výsledky jednotlivých pacientů ze séra, heparizované plazmy a EDTA plazmy. Všechny vzorky je nutno okamžitě po odběru uložit na led a je nutno je odstředit a oddělit od buněk co nejdříve to bude možné (do jedné hodiny). Silně lipemické vzorky jsou nevyhovující. Vzorky je nutno skladovat pevně uzavřené víčkem při teplotě 2-8°C po dobu 48 hodin nebo zmražené při teplotě -20°C, je-li testování odloženo⁶

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

Pouze pro diagnostické použití in vitro Bezpečnostní opatření

1. Přísně dodržujte pokyny uváděné v tomto letáku, zvláště co se týká manipulace a skladovacích podmínek.
2. Reagencie R1 a R3 obsahují azid sodný, který může reagovat s olověnými nebo měděnými instalacemi a vytvářet vysoce explozivní azidy kovů. Při likvidaci spláchněte velkým množstvím vody, abyste zabránili tvorbě azidů.
3. Záznamové listy bezpečnosti materiálů pro všechny nebezpečné součásti této soupravy jsou k dispozici na vyžádání od firmy Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Reagencie R1
Reagencie R3
Škodlivá

R22: Při požití škodlivá.

R32: Při kontaktu s kyselinami uvolňuje velmi toxický plyn.

S36/37/39: Používejte vhodný ochranný oděv, rukavice a ochranu očí/obličej.

S29/35: Nevylévejte do odpadu, likvidujte tento materiál a jeho nádobu bezpečným způsobem.

S46: Při požití vyhledejte okamžitě lékařskou pomoc a ukažte tuto nádobu nebo štítek.

PŘÍPRAVA

Materiály požadované avšak nedodávané

1. Deionizovaná voda
2. Analyzátor schopný vydávat tři reagenční a mající měřicí absorbanci při 340nm s řízením teploty (37°C).

ZKUŠEBNÍ PROTOKOL⁸

VÝSLEDKY

Výsledky jsou vytištěny Cobas MIRA v $\mu\text{mol/L}$.

KONTROLA KVALITY

Zajistěte, aby byla prováděna odpovídající údržba a kalibrace podle pokynů výrobce.

Testované kontrolní materiály s hodnotami pro homocystein v normálních i v odlišných rozsazích musejí být testovány, aby se zkontrolovala platnost charakteristiky reagenční. Jednotlivé laboratoře musí stanovit rozsah přijatelných kontrolních limitů. Firma Axis-Shield dodává sadu nízkých, středních a vysokých kontrolních vzorků.

REF FHER200

Kontrolní vzorky obsahují L-homocystein ve zpracovaném lidském séru v následujících koncentracích:

Kontrolní vzorek	Průměrná hodnota homocysteinu $\mu\text{mol/L}$	Rozsah homocysteinu $\mu\text{mol/L}$
Kontrolní vzorek L	7,0	5,6 – 8,4
Kontrolní vzorek M	12,5	10,0 – 15,0
Kontrolní vzorek H	25,0	20,0 – 30,0

DATA O VÝKONU

(Stanoveno na základě Cobas MIRA)

Přesnost

Korelační studie byly provedeny s čerstvou plazmou odebranou od dospělých. Všechny vzorky byly analyzovány pomocí enzymatického testu Abbott FPIA a testu Pacific Biometrics, Inc. HPLC. Na základě získaných dat byly vyvozeny následující statistické hodnoty:

Srovnávací metoda	Abbott FPIA	HPLC
Počet vzorků	85	30
Strmost regresivní křivky	0,964	1,059
Y-Intercept	0,728	-0,035
Korelační koeficient	0,993	0,989
Rozsah (μmol/L)	4,6-51,8	5,1-26,0

Přesnost

Studie přesnosti byly prováděny za použití Enzymatického homocysteinového testu podle dokumentu NCCLS Protokolu EP5-A⁷. Každý vzorek lidské EDTA plazmy byl testován duplikovaně ve 40 bězích rozvržených do 20 dnů. Výsledky jsou shrnuty níže:

Vzorek	Střední μmol/L	V průběhu CV%	Mezi běhy CV%	Celkové CV%
1	4,6	6,6	3,1	7,3
2	11,6	3,5	0,7	4,0
3	27,0	1,6	1,5	2,6

Analytická sensitivita

Byla zjištěna analytická sensitivita testu u enzymatického homocysteinu 0,40 μmol/L

Analytická specifická

Specifická testu byla vyhodnocena pro interferující látky specifikované v níže uvedené tabulce:

Interferující látka	Koncentrace interferující látky	% interference
Bilirubin	20 mg/dL	< 5%
Hemoglobin	1 000 mg/dL	< 5%
Lipemie	1 000 mg/dL	< 10%
Glutathion	20 μmol/L	< 5%
Metionin	800 μmol/L	< 5%
Cystein	200 μmol/L	< 5%
Pyruvát	1000 μmol/L	< 5%

Žádná z uvedených látek v testu signifikantně neinterferovala (<10%).

Viz odkazy (5,6), kde jsou uvedeny interference způsobené léky, chorobou nebo preanalytickými proměnnými hodnotami.

Carryover (přenos)

Testy na carryover ukazují, že carryover je nižší než je citlivost této zkoušky.

OČEKÁVANÉ HODNOTY

Studie se prováděla se vzorky od 131 dospělých osob (59 mužů a 72 žen ve věku od 18 do 86 let), kteří byli na pohled zdraví.

Vzorky plazmy (EDTA) byly zkoušeny na celkový homocystein testem na enzymatický homocystein a referenční rozsah pro homocystein podle této metody je následující:

Dospělí 4,0 -15,4 μmol/L

Tyto hodnoty je nutno považovat za vodítko pro očekávané hodnoty. Každé laboratoři se doporučuje stanovit rozsah normálních hodnot pro populaci, pro kterou slouží.

OMEZENÍ POUŽITÍ

1. Linearita testu na enzymatický homocystein, pokud probíhá tak, jak je nařízeno, je 50 $\mu\text{mol/L}$. Vzorky s hodnotami vyššími než 50 $\mu\text{mol/L}$ je nutno rozředit 1 ku 3 ve fyziologickém roztoku a výsledek vynásobit třemi ($\times 3$).
2. Reagencie R1 musí být čirá. Je nutno ji vyřadit, jestliže se zakalí nebo je-li výchozí absorbance nižší než 0,700.
3. Cystationin se měří s homocysteinem, avšak v obecné populaci má hladina cystationinu (0,065 to 0,3 $\mu\text{mol/L}$) zanedbatelný účinek. V některých případech se mohou hladiny cystationinu zvýšit v případě ledvinových onemocnění pacientů s vážnými metabolickými poruchami a způsobit větší interferenci než 20 %. I když některé studie ukázaly, že nejsou postižení žádní pacienti, jiné studie ukazují, že tento účinek může být pozorován až u 10 % pacientů s onemocněním ledvin.
4. **Léky jako methotrexát, carbamazepin, phenytoin, oxid dusný nebo 6-azauridintriacetát mohou mít vliv na koncentraci plazmového homocysteinu^{5,6}.**

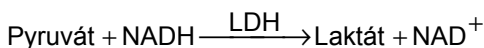
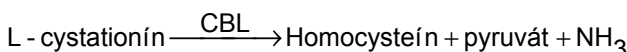
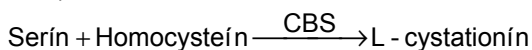
Kvantitatívny rozbor enzymatického homocysteínu je určený pre kvantitatívne určenie *in vitro* celkového množstva homocysteínu v ľudskom sére a plazme. Tento kvantitatívny rozbor je určený iba pre profesionálne použitie.

ÚVOD



Homocysteín (HCY) je vedľajším produktom metabolizmu proteínov, zvlášť rozkladu esenciálnej aminokyseliny, metionínu. Nie je samotný zabudovaný do proteínov, ale neskôr sa rozkladá pomocou enzýmov na cysteín alebo je konvertovaný späť na metionín. V malom množstve homocysteín nie je škodlivý pre telo alebo cievy, ale keď sa nadmerné množstvá v krvnom obeh, môžu sa poškodiť arteriálne cievy a výsledný zápal môže prípadne spôsobiť zablokovanie prívodu krvi k srdcu. Klinické štúdie sa začali v roku 1969, keď Dr. Kilmer S. McCully oznámil, že deti, ktoré sa narodili s genetickou chybou metabolizmu, ktorá spôsobuje zvýšené úrovne homocysteínu (homocystinúria), umierajú na ťažké ochorenie tepien vo veľmi mladom veku¹. Novšie štúdie získavajú dôkazy, že zvýšené hodnoty homocysteínu v krvi majú prediktívnu hodnotu v prípade rizika ochorenia koronárnych tepien, ktoré sa podobajú zvýšených úrovni cholesterolu^{2,3}. Najnovší dôkaz implikuje zvýšené úrovne homocysteínu v krvi pri samovoľných potratoch a fyzických alebo biochemických poruchách pri pôrode⁴.

PRINCÍP KVANTITATÍVNEHO ROZBORU

Viazaný alebo dimeryzovaný homocysteín (oxidizovaná forma) je redukovaný na voľný homocysteín, ktorý potom reaguje so serínom, katalyzovaný syntázou beta cystationínu (CBS) na L cystationín. Cystationín sa následne rozkladá pomocou beta-lyázy cystationínu (CBL), aby sa vytvoril homocysteín, pyruvát a amoniak. Pyruvát sa potom konvertuje pomocou dehydrogenázy laktátu (LDH) na laktát s NADH ako koenzýmom. Pomer konverzie NADH na NAD je priamo úmerný koncentrácii homocysteínu (ΔA_{340} nm).



KOMPONENTY SÚPRAVY

Enzymatické činidlo homocysteínu R1	Čistá tekutina bez zápachu	Jantárová ampulka 1 x 36ml	NADH (0,56mM), LDH (65KU/L), Serín (1,3mM), Trizma základ 1-10%, Trizma hydrochlorid 1-10%, Azid sodný <1%. Pripravené na použitie	Xn 
Enzymatické činidlo homocysteínu R2	Čistá tekutina bez zápachu	Bezfarebná ampulka 1 x 15ml	Redukčné činidlo (TCEP;25mM). Pripravené na použitie	
Enzymatické činidlo homocysteínu R3	Svetložltá tekutina bez zápachu	Jantárová ampulka 1 x 5ml	Cyklovacie enzýmy CBS (0,748KU/L) a CBL (16,4KU/L) Azid sodný <1%. Pripravené na použitie	Xn 
Kalibrátor 1 enzymatického homocysteínu	Čistá tekutina bez zápachu	Bezfarebná ampulka 1 x 3ml (modré viečko)	Vodný homocysteín čistý (0 μ mol/L). Pripravené na použitie	
Kalibrátor 2 enzymatického homocysteínu	Čistá tekutina bez zápachu	Bezfarebná ampulka 1 x 3ml (červené viečko)	Vodný roztok homocysteínu (27 μ mol/L). Pripravené na použitie	

Kalibrátory sú pripravené gravimetricky a sú sledovateľné pomocou príslušného procesu merania (HPLC). Hodnoty sú vytlačené na nálepkách (0 μ mol/L and 27 μ mol/L).

SKLADOVANIE ČINIDIEL

Manipulácia a procedurálne upozornenia

Enzymatické činidlá a kalibrátory homocysteínu by sa mali skladovať schladené pri 2-8°C. **NEZMRAZOVAŤ**. Činidlá a kalibrátory sú stabilné, keď sú uskladnené tak, ako boli dodané až do expiračných dátumov na nálepkách. Činidlá sú stabilné na doske prístrojov až do 30 dní. Nezmiešavajte dávky činidiel.

Získavanie vzoriek a manipulácia

Čerstvá EDTA alebo heparinizovaná plazma, bez hemolýzy alebo zákalu, je odporúčanou vzorkou pre merania homocysteínu. Tak isto sa môže použiť sérum získané v skúmavkách separátora séra. Napriek tomu sa neodporúča používať zameniteľne výsledky jednotlivého pacienta zo séra, heparinizovanej plazmy a EDTA plazmy. Všetky vzorky musia byť po zbere okamžite uložené na ľad a mali by byť odstredené a oddelené od buniek čo najskôr. Výrazne lipemické vzorky nie sú uspokojivé. Vzorky by sa mali uskladňovať tesne uzatvorené pri teplote 2-8°C do 48 hodín, alebo zmrazené pri -20°C, ak je testovanie oneskorené⁶.

UPOZORNENIA A OPATRENIA

Iba pre in vitro diagnostiku

Bezpečnostné opatrenia

1. Prísne dodržiavajte pokyny na tomto letáku, zvlášť o manipulačných a skladovacích podmienkach.
2. Činidlá R1 a R3 obsahujú azid sodný, ktorý môže reagovať s olovenými alebo medenými inštalacionými trúbkami vytvorením vysoko výbušných kovových azidov. Pri likvidácii vypláchnite veľkými množstvami vody, aby sa predišlo vytváraniu azidov.
3. Karty bezpečnostných údajov materiálu pre všetky nebezpečné komponenty tejto súpravy sú dostupné na požiadanie od Axis-Shield Diagnostics Ltd.



Činidlo R1
Činidlo R3
škodlivé

R22: Škodlivé pri prehltnutí.

R32: Kontakt s kyselinami uvoľňuje veľmi toxický plyn.

S36/37/39: Noste vhodné ochranné oblečenie, rukavice a ochranu očí/tváre.

S29/35: Nevypúšťajte do kanalizácie, tento materiál a jeho nádoby sa musia likvidovať bezpečným spôsobom.

S46: V prípade prehltnutia okamžite vyhľadajte lekársku pomoc a ukážte túto nádobu alebo nálepku.

PRÍPRAVA

Požadovaný materiál, ktorý nie je zabezpečený

1. Deionizovaná voda.
2. Analyzátor schopný dávkovať tri činidlá a merať absorpciu pri 340 nm s reguláciou teploty (37°C).

PROTOKOL KVANTITATÍVNEHO ROZBORU⁸

VÝSLEDKY

Výsledky sú vytlačené pomocou Cobas MIRA v $\mu\text{mol/L}$.

RIADENIE KVALITY

Zabezpečte, aby bola vykonaná adekvátna údržba a kalibrácia v súlade s pokynmi výrobcu.

Kontrolné materiály kvantitatívne hodnoty s hodnotami homocysteínu v normálnom aj abnormálnom rozsahu by sa mali testovať kvôli validácii výkonu činidla. Rozsah prijateľných kontrolných limitov by sa mal stanoviť v jednotlivých laboratóriách. Axis-Shield poskytuje súpravu nízkeho, stredného a vysokého etalónu.

REF FHER200

Etalóny obsahujú L-homocysteín v spracovanom ľudskom sére v nasledovných koncentráciách:

Etalón	Stredná hodnota HCY ($\mu\text{mol/L}$)	Rozsah HCY ($\mu\text{mol/L}$)
Etalón L	7,0	5,6 – 8,4
Etalón M	12,5	10,0 – 15,0
Etalón H	25,0	20,0 – 30,0

ÚDAJE O ÚČINNOSTI

(Vytvorené na základe Cobas MIRA)

Určitosť

Korelačné štúdie boli vykonané s čerstvou plazmou od dospelých. Všetky vzorky boli analyzované s použitím enzymatického kvantitatívneho rozboru, kvantitatívneho rozboru Abbott FPIA a HPLC kvantitatívneho rozboru Pacific Biometrics, Inc. Získané údaje poskytli nasledovné štatistické hodnoty:

Porovnávací metóda	Abbott FPIA	HPLC
Počet vzoriek	85	30
Sklon regresnej čiary	0,964	1,059
Y-Intercept	0,728	-0,035
Korelačný koeficient	0,993	0,989
Rozsah ($\mu\text{mol/L}$)	4,6-51,8	5,1-26,0

Presnosť

Presné štúdie boli vedené s použitím Enzymatického kvantitatívneho rozboru homocysteínu podľa protokolu NCCLS dokumentu EP5-A⁷. Každá vzorka EDTA ľudskej plazmy bola opakovane spustená štyridsať krát počas 20 dní. Výsledky sú sumarizované nižšie:

Vzorka	Stredná ($\mu\text{mol/L}$)	Počas chodu CV%	Medzi spusteniami CV%	Spolu CV%
1	4,6	6,6	3,1	7,3
2	11,6	3,5	0,7	4,0
3	27,0	1,6	1,5	2,6

Analytická citlivosť

Zistila sa analytická citlivosť enzymatického kvantitatívneho rozboru homocysteínu na 0,40 $\mu\text{mol/L}$.

Analytická špecifickosť

Špecifickosť kvantitatívneho rozboru bola vyhodnotená pre interferujúce substancie v tabuľke uvedenej nižšie.

Interferujúca substancia	Koncentrácia interferujúcej substancie	% interferencie
Bilirubín	20 mg/dL	< 5%
Hemoglobín	1000 mg/dL	< 5%
Lipémia	1000 mg/dL	< 10%
Glutatión	20 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Metionín	800 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Cysteín	200 $\mu\text{mol/L}$	< 5%
Pyruvát	1000 $\mu\text{mol/L}$	< 5%

Žiadna z týchto substancií významne v kvantitatívnom rozbere neinterferuje (<10%).

Postupujte podľa referencií (5,6) pre možné interferencie spôsobené drogami, nemocou alebo preanalytickými premennými.

Prenos

Prenosové štúdie ukazujú, že prenos je nižší ako je citlivosť kvantitatívneho rozboru.

OČAKÁVANÉ HODNOTY

Bola vykonaná štúdia s použitím vzoriek od 131 dospelých (59 mužov a 72 žien, vo veku od 18 až 86 rokov), ktorí boli domnelo zdraví. Bol vykonaný kvantitatívny rozbor vzoriek plazmy (EDTA) homocysteínu pomocou Enzymatického kvantitatívneho rozboru homocysteínu a referenčný rozsah homocysteínu pre túto metódu je:

Dospelý 4,0-15,4 $\mu\text{mol/L}$

Tieto hodnoty sa majú posudzovať ako vodidlá pre očakávané hodnoty. Každé laboratórium je podporované vo vytvorení rozsahu normálnych hodnôt pre populáciu, ktorú obsluhujú.

OBMEDZENIA POUŽITIA

1. Lineárnosť enzymatického kvantitatívneho rozboru homocysteínu, keď je vykonaný podľa predpisu, je 50 $\mu\text{mol/L}$. Vzorky s hodnotami vyššími ako 50 $\mu\text{mol/L}$ by mali byť zriedené v pomere 1 ku 3 vo fyziologickom slanom roztoku a výsledok sa má vynásobiť tromi (x3).
2. Činidlo R1 by malo byť čisté. Ak je zakalené alebo jeho počiatočná absorbanca je nižšia ako 0,700, musí sa zlikvidovať.
3. Cystationín sa meria s homocysteínom, ale vo všeobecnosti má úroveň cystationínu v populácii (0,065 na 0,3 $\mu\text{mol/L}$) zanedbateľný efekt. V niektorých prípadoch môžu hladiny cystationínu stúpnuť pri pacientoch s ochorením obličiek s vážnymi metabolickými poruchami a spôsobiť viac než 20 % interferenciu. Hoci niektoré štúdie ukázali, že žiadni pacienti neboli ovplyvnení, iné ukázali, že tento efekt sa dá zistiť u viac ako 10% pacientov s chorobami obličiek.
4. **Drogy, také ako metotrexát, carbamazepín, fenytoín, oxid dusný, alebo triacetát 6 azauridín môžu ovplyvniť koncentrácie homocysteínu v plazme^{5,6}.**

REFERENCES

1. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis, *Am J Pathol.* 1969;56:111-128.
2. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine: I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci.* 1993;23:447-493.
3. Cramer DA. Homocysteine vs cholesterol-competing views, or a unifying explanation of arteriosclerotic cardiovascular disease? *Laboratory Medicine* vol. 29, no. 7, July 1998.
4. Rosenquist TH, Ratashak SA, Selhub J. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: effect of folic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:15227-15232.
5. Young, DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests, 5th ed., AACC Press, Washington, DC, 2000, p 3-441.
6. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, *et al*, Total Homocysteine in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications, *Clin Chem* 1993;39:1764-79.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices; Approved Guidelines.* NCCLS Document EP5-A, Wayne, PA:NCCLS, 1999.
8. Assay Protocol /Protocole du Dosage / Assayprotokoll / Protocollo Analisi / Protocolo del Ensayo / Analysprotokoll / Analyseprotokol / Zkušební Protokol / Protokol Kvantitatívneho Rozboru:

Cobas MIRA

Ensure that the assay parameters exactly match those listed below. *Note: The default settings are marked with an asterisk (*) / S'assurer que les paramètres du dosage correspondent exactement à ceux figurant ci-dessous. Remarque : les réglages implicites sont accompagnés d'un astérisque (*) / Es ist sicherzustellen, dass die Assayparameter den nachstehend aufgeführten Parametern genau entsprechen. Hinweis: Die Voreinstellungen sind mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet / Verificare che i parametri di analisi corrispondano esattamente a quelli elencati di seguito. Nota: Le impostazioni predefinite sono contrassegnate da un asterisco (*) / Es necesario asegurarse de que los parámetros del ensayo coinciden exactamente con los que se indican a continuación. Nota: Los valores implícitos ("por defecto") van marcados con un asterisco (*) / Försäkra dig om att analysparametrarna matchar exakt de som uppräknas nedan. Obs: Standardinställningarna är markerade med en asterisk (*) / Sørg for, at analyseparametrene er nøjagtigt de samme, som er angivet nedenfor. Bemærk: Standardindstillingerne er markerede med en stjerne (*) / Zajistěte, aby parametry zkoušky přesně odpovídaly níže uvedeným parametrům. Poznámka: Implicitní nastavení je označeno hvězdičkou (*) / Zabezpečte, aby parametre kvantitatívneho rozboru presne zodpovedali tým, ktoré sú uvedené nižšie. Poznámka: Implicitné nastavenia sú označené hviezdičkou (*)*

```

GENERAL      Measurement Mode : ABSORB
              Reaction Mode  : R-S-SR1-SR2
              Calibration Mode: SLOPE AVG
              Reagent Blank  : REAG/SOL
              Cleaner        : BEFORE
              Wavelength     : 340 nm
              Decimal Position : 1
              Unit           : µmol/L

ANALYSIS     *Post Dil. Factor : NO
              *Conc Factor  : NO
              Sample CYCLE  : 1
              Volume        : 24.0 µl
              Diluent NAME  : H2O
              Volume        : 10.0 µl
              Reagent CYCLE : 1
              Volume        : 280µl

              Start R1 CYCLE : 2
              Volume        : 34.0 µl
              Diluent NAME  : H2O
              Volume        : 5.0 µl
              Start R2 CYCLE : 11
              Volume        : 28.0 µl
              Diluent NAME  : H2O
              Volume        : 5.0 µl

CALCULATION  Sample Limit   : NO
              Reac. Direction : DECREASE
              Check           : ON

              *Convers. Factor : 1.00000
              *Offset          : 0.00000
              *Test Range Low  : NO
              *High            : NO
              *Norm. Range Low : NO
              *High            : NO
              Number of Steps  : 1
              Calc. Step A     : KINETIC
              Readings         : FIRST 14 LAST 24
              *Reaction Limit  : NO

CALIBRATION  Calib. Interval : EACH RUN
              Blank SOL-POS   : 1
              *Reag. Range Low : NO
              *High           : NO
              *Blank Range Low : NO
              *High           : NO

              Standard POS    : USER DEFINED
              STD 1           : VALUE ON BOTTLE
              STD 2           : NO
              STD 3           : NO
              Replicate       : DUP
              *Deviation      : NO

*CONTROL     *CS1 Pos        : NO
              *CS2 Pos        : NO
              *CS3 Pos        : NO

```

IVD

For in vitro diagnostic use/Pour usage diagnostique in vitro/Nur zur In-vitro-Diagnose verwenden/Per uso diagnostico in vitro/Para uso de diagnóstico *in vitro*/För in vitro diagnostik/Kun til in vitro diagnostik/Pouze pro diagnostické použití in vitro/Iba pre in vitro diagnostiku

REF

Catalogue number/Réf. Catalogue/Katalognummer/Numero del catalogo/Núm. de catálogo/Katalognummer/Bestillingsnummer/Katalogové číslo/Katalógové číslo

LOT

Lot/Lot/Charge/Lotto/Lote/Lotnummer/Parti/Šarže/Šarža

100

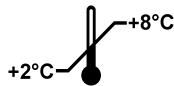
100 tests/100 tests/100 Nachweise/100 test/100 tests/100 tester/100 tests/100 testů/100 testov



See instructions for use/Voir le mode d'emploi/Siehe Gebrauchsanweisung/Vedere le istruzioni per l'uso/Véanse las instrucciones para su uso/Se bruksanvisning/Se brugsvejledningen/Viz návod pro použití/Pozri pokyny na používanie



Use by/Utiliser avant le/Haltbar bis/Usare con/Debe ser usado antes de/Använd före/Brug før/Použití (kým)/Použité (kým)



Store at 2-8°C/Conserver à 2-8°C/Lagerung bei 2 - 8 °C /Conservare a 2-8°C/Almacenar a 2-8°C/Förvaras vid 2-8°C/Opbevar ved 2-8°C/Skladovat při teplotě 2-8°C/Skladovať pri 2-8°C



Manufactured by/ Fabriqué par/Hergestellt von/Prodotto da /Fabricado por/Tillverkat av/Fremstillet af/Vyrobil/Vyrobené

R 1

Reagent R1,R2,R3/Réactif R1,R2,R3/Reagens R1,R2,R3/Reagente R1,R2,R3/Reactivo R1,R2,R3/Reagens R1,R2,R3/Reagent R1,R2,R3/Reagencie R1, R2, R3/Činidlo R1, R2, R3

CAL 1

Calibrator 1, Calibrator 2/ Etalonneur 1, Etalonneur 2/Kalibriermittel 1, Kalibriermittel 2/Calibratore 1, Calibratore 2/Calibrador 1, Calibrador 2/Kalibrator 1, Kalibrator 2/Kalibrator 1, Kalibrator 2/Kalibrátor 1, kalibrátor 2/Kalibrátor 1, kalibrátor 2