



MDSS
Schiffgraben 41
30175 Hannover, Germany
12889 Gregg Court
Poway, CA 92064, USA
Tel: (858) 455-4754
Fax: (858) 455-4750

Homocysteine 2 Reagent Enzymatic Assay

Složení

Reagencie pro test Diazyme Homocysteine 2 jsou poskytovány ve velkém množství a v sadě jsou obsaženy v následujícím zastoupení.

Typ balení	Kat. číslo	Objem
Univerzální balení	DZ568B-K	R1: 1 x 52 ml R2: 1 x 15 ml
Systém Olympus AU s čárovým kódem.	DZ568B-BY1	R1: 1 x 52 ml R2: 1 x 15 ml
	DZ568B-BY2	R1: 2 x 52 ml R2: 2 x 15 ml

Poznámka: Kalibrátor je prodáván samostatně.

Použití

Diazyme Homocysteine 2 Reagent Enzymatic Assay slouží ke kvantitativnímu určení obsahu L-homocysteinu ve vzorcích séra nebo plazmy *in vitro*. Test může být užitečný při diagnostice a léčbě pacientů se suspektní hyperhomocysteinémií nebo homocystinurií.

Pacienti, kteří užívají methotrexát, karbamazepin, fenytoin, N₂O, antikonvulziva nebo 6-azuridin triacetát mohou mít vyšší hladiny Hcy způsobené interakcemi výše uvedených léčiv s metabolismem Hcy.

Klinický význam

Homocystein (Hcy) je aminokyselina obsahující thiolovou skupinu a je produkována intracelulární demethylací metioninu. Celkový homocystein (tHcy) zahrnuje všechny formy Hcy, včetně oxidované, vázané na protein a volné.

Zvýšená hladina tHcy je významným rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění.¹⁻³ Nadbytečný Hcy v krevním řečišti může díky své dráždivé povaze způsobit poškození arterií, což následně způsobuje zánět a tvorbu plátů, které mohou být příčinou obstrukce krevního zásobení srdce.

Zvýšené hladiny tHcy jsou způsobené čtyřmi hlavními příčinami: a) geneticky podmíněný deficit enzymů účastnících se metabolismu Hcy, jako je cystathionin beta-syntáza (CBS), methioninsyntáza (MS), a methylenetetrahydrofolát reduktáza (MTHFR); b) nutriční deficit vitamínů B řady, jako jsou B₆, B₁₂ a kys. listová; c) neschopnost ledvin efektivně odstraňovat aminokyseliny z krve a d) interakce léků, jako je N₂O, methotrexát a fenytoin, které ovlivňují metabolismus Hcy.

Zvýšené hladiny tHcy jsou rovněž spojené s Alzheimerovou chorobou⁴ a osteoporózou⁵. V nedávné době byly vydány směrnice pro stanovení tHcy v klinických laboratořích.⁶

Princip testu

Test Diazyme Homocysteine 2 Reagent Enzymatic assay pracuje na neobvyklém principu, při kterém se stanovuje ko-substrátový konverzní produkt (molekula, která není substrátem Hcy konvertujícího enzymu a neobsahuje žádnou část vzorku Hcy) namísto stanovení ko-substrátu nebo konverzního produktu Hcy, jak se uvádí v odborné literatuře. V tomto testu je oxidovaný Hcy nejprve redukován na volný Hcy, který následně reaguje s ko-substrátem, S-adenosylmethioninem (SAM) v reakci, která je katalyzovaná Hcy S-methyltransferázou, čímž vzniká methionin (konverzní produkt Hcy) a S-adenosylhomocystein (SAH, ko-substrátový konverzní produkt).

SAH je pak stanoven pomocí navazujících enzymatických reakcí zahrnujících SAH hydrolázu, adenosin (Ado) deaminázu a glutamátdehydrogenázu, kdy je SAH hydrolyzován na adenosin (Ado) a Hcy SAH hydrolázou. Takto vytvořený Hcy, který pochází původem z ko-substrátu SAM je začleněn do cyklické reakce přeměny Hcy S-methyltransferázou. Tím vzniká cyklický systém reakcí založený na ko-substrátovém konverzním produktu, který vykazuje znatelné zesílení detekovaných signálů. Vznikající Ado je okamžitě hydrolyzován na inosin a amoniak, který reaguje s glutamátdehydrogenázou za souběžné přeměny NADH na NAD⁺. Koncentrace Hcy ve vzorku je nepřímě úměrná množství NADH přeměněného na NAD (Δ A_{340nm}).

Potřebné vybavení, které není součástí soupravy

Analyzátor schopný dávkovat 2 reagenty a měřit absorbanci při vlnové délce 340 nm, s možností nastavit teplotu (na 37° C).

Kalibrátory jsou prodávány samostatně (Kat. číslo DZ568B-CAL a DZ568A-CA5)

Kontroly jsou prodávány samostatně (Cat. No. DZ568A-CON).

Složení reagentů

Aktivní složky	Koncentrace
S-adenosylmethionin (SAM)	0,1 mM
NADH	>0,2 mM
TCEP	>0,5 mM
2-oxoglutarát	5,0 mM
Glutamátdehydrogenáza	10 KU/l
SAH hydroláza	3,0 KU/l
Adenosindeamináza	5,0 KU/l
Hcy methyltransferáza	5,0 KU/l

Příprava reagentů

Reagencie testu Diazyme Homocysteine 2 Reagent Enzymatic assay jsou stabilní reagenty v tekuté formě připravené k použití. Kalibrátory a kontroly jsou stabilní tekutiny připravené k použití.

Stabilita a uchovávání reagentů

Reagencie, kalibrátory a kontroly Diazyme Homocysteine 2 Reagent Enzymatic assay by měly být skladovány při teplotě 2-8° C. **NEZMRAZUJTE.** Reagencie, kalibrátory a kontroly jsou stabilní až do data expirace uvedeného na štítku, pokud jsou skladovány podle instrukcí. Nemíchejte reagenty z různých šarží.

Odběr vzorků a jejich příprava

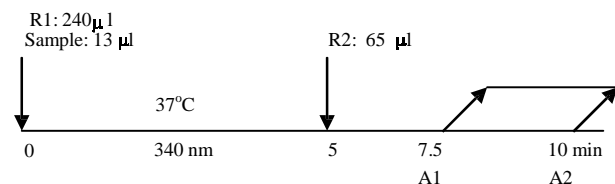
V testu může být použito čerstvé sérum, heparinizovaná plazma nebo plazma ošetřená EDTA. Vzorky krve je třeba ihned po odběru centrifugovat, aby se oddělila plazma od krevních buněk. Pokud není možné vzorky centrifugovat okamžitě, měly by být uchovány v ledu a centrifugovány během hodiny. Vzorky, které jsou hemolyzované, kalné nebo vykazují vysokou lipémií doporučujeme v testu nepoužívat. Po separaci buněk od plazmy je Hcy stabilní nejméně po dobu čtyř dní při pokojové teplotě, po několik týdnů při teplotách 0-8° C a při teplotě -20° C po několik měsíců až let.⁷

Bezpečnostní instrukce

Reagencie jsou určeny výhradně k *in vitro* diagnostice. **REAGENCIE NEPOLYKEJTE.** Zabraňte kontaktu s kůží a očima. Obsahuje azid sodný, který může reagovat s mědí nebo olovem za vzniku výbušných směsí. Dobře proplachujte vodou při odstraňování zbytků této reagencie ve výlevce. Kalibrátory a kontroly se vyrábí z lidského séra. Reagencie obsahují glycerol jako stabilizátor. Automatizované chemické analyzátoři jsou vybaveny integrovaným mycím systémem, který má zabránit nežádoucímu přenosu reagentů sondou. Efektivita integrovaného mycí sondy se však u různých přístrojů liší a je možné, že bude nutné zavést do postupu další mycí kroky - viz. technický manuál. Se vzorky obsahujícími materiál lidského původu by mělo být nakládáno jako s potenciálně infekčními dle laboratorních bezpečnostních postupů, jako jsou ty, které jsou popsány v Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (HHS Publication Number [CDC] 93-8395). Dodatečné bezpečnostní instrukce týkající se skladování a zacházení s tímto produktem naleznete v bezpečnostním listu (MSDS) tohoto produktu. Chcete-li ho obdržet, kontaktujte naše oddělení zákaznických služeb na tel. 858-455-4768.

Průběh testu

Před vzorkováním jemně promíchejte kalibrátor a kontrolu vířivým pohybem, aby byla zajištěna homogenita. Po každém použití je ihned uzavřete víčkem a vraťte do skladovacího prostoru s teplotou 2-8° C.



Aplikační listy pro použití testu na automatizovaných klinických analyzátořích jsou dostupné na vyžádání. Volejte na tel. 858-455-4768, pošlete fax na 858-455-3701, nebo email na adresu: support@diazyme.com.

Kalibrace

Pro kalibraci analyzátorů použijte kalibrátory 1-5. Kalibrační křivka je stabilní nejméně po dobu pěti dnů.

Kontrola kvality

Doporučujeme, aby každá laboratoř používala Hcy kontroly k potvrzení platnosti a správnosti Hcy testu. Set normálních a abnormálních intervalů je součástí sortimentu Diazyme Laboratories (kat. číslo DZ568A-CON). Přijatelné kontrolní intervaly by měly být stanoveny individuálními laboratořemi.

Výsledky

Výsledky jsou vytištěny v µmol/l. Poznámka: Pokud je hodnota ve vzorku vyšší než 50 µmol/l, měl by být vzorek zředěn vodou v poměru 1:1 a test opakován. Výsledek pak vynásobíte dvěma.

Referenční interval

Ve většině klinických laboratořích v USA je 15 µmol/l hraniční hodnota pro normální hladiny Hcy u dospělých.^{8,9} V Evropě se používá jako hraniční hodnota 12 µmol/l. Doporučujeme, aby si každá laboratoř vytvořila vlastní intervaly z fyziologických hodnot vyskytujících se v populaci dané oblasti.

Omezení

- Rozsah měřitelných hodnot je 3 až 50 µmol/l. Vzorky s hodnotami vyššími než 50 µmol/l by měly být zředěny vodou v poměru 1:1.
- Roztok reagentů by měl být čirý. Roztok by neměl být používán, pokud je zakalený nebo pokud je počáteční absorbance nižší než 0.5 při vlnové délce 340 nm (délka optické dráhy 0.6 cm).
- S-adenosylhomocystein (SAH) způsobuje znatelnou pozitivní interferenci. Ve fyziologické plazmě je však nedetekovatelný nebo se pohybuje v koncentracích nižších než v nmol/l a neměl by působit problémy.

- Pacienti, kteří užívají methotrexát, karbamazepin, fenytoin, N₂O, antikonvulziva nebo 6-azuridin triacetát mohou mít vyšší hladiny Hcy způsobené interakcemi výše uvedených léčiv s metabolismem Hcy.
- Pro utlumení tvorby Hcy v erythrocytech bylo navrženo přidání 3-deazaadenosinu. V testu Diazyme Hcy však vzorky obsahující 3-deazaadenosin nemohou být použity, protože inhibuje jeden z klíčových enzymů použitých v tomto testu.

Charakteristika výkonu

Detekční limit

K určení detekčního limitu (LOD) testu Diazyme Homocysteine 2 Reagent Enzymatic Assay byl testován kalibrátor zero a 12 replikátů. LOD byl definován jako průměr + 3x směrodatná odchylka (SD).

Kalibrátor zero	
n	12
průměr	0,05
SD	0,117
průměr+3SD	0,40
LOD= 0,4 µM HCY	

Přesnost ve srovnání

Testováním 40 vzorků séra a plazmy byly provedeny korelační studie, ve kterých byl test srovnáván se současnými metodami stanovení hodnot Hcy. Lineární regresní přímka má korelační koeficient r² 0,99, sklon 0,94 a průsečík s osou y 1,05.

Přesnost

Studie hodnotící přesnost byly provedeny podle protokolu NCCLS EP-5 s následujícími úpravami. Vnitřní přesnost (Variační koeficient%) prošly čtyři vzorky obsahující 7,0; 12,0; 15,6; a 29,0 M HCY testem HCY Enzymatic Assay na přístroji OLYMPUS AU400 s 20 replikátů v průběhu jednoho dne. Variační koeficient (CV%) pro čtyři úrovně Hcy ve vzorcích séra je 4,5% pro 7 µM Hcy, 1,87% pro 12 µM Hcy, 3,04% pro 15,6 µM Hcy a 2,4% pro 29,0 µM Hcy. Pro zjištění odchylek v přesnosti mezi jednotlivými testy byly čtyři vzorky HCY obsahující 7,0, 12, 15,6 a 29,0 µM HCY testovány i se svými triplikáty dvakrát denně po dobu pěti dnů. Nepřesnost mezi testy pro čtyři úrovně Hcy kontrol je 5,87% pro 7 µM Hcy, 4,88% pro 12 µM Hcy, 5,51% pro 15,6 µM Hcy a 2,57% pro 29,0 µM Hcy.

Linearita

Test má lineární charakter do 50 µmol/l Hcy.

Rušivé vlivy

Testováním sérového vzorku s různými koncentracemi endogenních látek byla provedena interferenční studie. Následující látky, které se v séru běžně vyskytují, zapříčinily při uvedených koncentracích odchylku nižší než 10%: 40 mg/dl bilirubinu, 1000 mg/dl triglyceridů, 500 mg/dl hemoglobinu, 40 mg/dl konjugovaného bilirubinu, 10 mM kyseliny askorbové a 100 µM** cystathioninu.

** Testované koncentrace jsou přibližně 5-10 krát vyšší než jsou fyziologické hodnoty v séru.

Reference

1. Eikelboom JW, et al. *Ann Intern Med* 131:363-75, (1999)
2. Scott J, Weir D. *Q J Med* 89: 561- 3 (1996)
3. Nygard O, *N Engl J Med.* 337(4):230-6(1997)
4. Seshadri S. et al. *N. Engl. J. Med.* 346:477-483(2002)
5. McLean R. et al. *N. Engl. J. Med.* 350: 2042-2049 (2004)
6. Refsum H. *Clinical Laboratory News* May 2002, pp 2-14
7. Guttormsen AB et al. *J Nutr.* 124(10):1934-41 (1994)
8. Vilaseca et al. *Clin. Chem.* 43: 690-692 (1997)
9. Faure-Delanef et al. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 999-1001 (1997)