

# Axis-Shield Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Assay

REF B08176

(Distributer je kompanija BECKMAN COULTER; sredstvo je namenjeno samo za profesionalnu upotrebu na platformama kompanije BECKMAN COULTER AU (AU400, AU480, AU680, AU5800 I DxC 700 AU))



Axis-Shield Diagnostics Ltd.  
The Technology Park  
Dundee DD2 1XA  
United Kingdom  
Tel: +44 (0) 1382 422000  
Faks: +44 (0) 1382 422088



## SRPSKI:

## NAMENA

Sredstvo Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent namenjeno je za *in vitro* kvantitativno određivanje ukupnog homocisteina u humanom serumu i plazmi. Ovo sredstvo može da pomogne u dijagnostikovanju i lečenju pacijenata za koje se sumnja da imaju hiperhomocisteinemiju i homocistinuriju.

**UPOZORENJE:** Uzorci pacijenata koji su pod terapijom koja sadrži S-adenozil-metionin mogu da daju lažno povišene vrednosti homocisteina. Pacijenti koji uzimaju metotreksat, karbamazepin, fenitoin, azotsuboksid, antiepileptike ili 6-azauridin triacetat mogu imati povišene vrednosti homocisteina zbog uticaja pomenutih supstanci na metabolički put. Pogledajte odeljak OGRANIČENJA UPOTREBE u uputstvu za upotrebu ove analize.

## KRATAK PREGLED I OBJAŠNJENJE ANALIZE

Homocistein (HCY) je aminokiselina koja sadrži tiol, nastala intracelularnom demetilacijom metionina. Homocistein se transportuje u plazmu, u kojoj cirkuliše, prevashodno u svom oksidisanom obliku, vezan za proteine plazme u vidu mešovitog disulfida protein-HCY sa albuminom (protein-SS-HCY).<sup>1-5</sup> Prisutne su manje količine redukovanog homocisteina i disulfidnog homocisteina (HCY-SS-HCY). Ukupni homocistein (tHCY) predstavlja zbir svih oblika HCY u serumu i plazmi (slobodnog i vezanog za proteine). Homocistein se metaboliše na cistein ili metionin. Kod transulfuracionog puta sa vitaminom B6, homocistein se bespovratno kataboliše na cistein. Veliki deo homocisteina podleže remetilaciji na metionin, uglavnom pomoću enzima metionin-sintaze koji zavisi od folata i kobalamina. Kada su ove reakcije narušene, homocistein se nakuplja i izlučuje u krv.<sup>3,5</sup> Izrazito povišena koncentracija ukupnog homocisteina sreće se kod osoba sa homocistinurijom, retkim genetskim poremećajem enzima koji učestvuju u metabolizmu homocisteina. Kod pacijenata sa homocistinurijom javljaju se mentalna retardacija, rana arterioskleroza i arterijska i venska tromboembolija.<sup>2,6</sup> Beleže se i drugi, manje teški genetski poremećaji koji dovode do umereno povišenih vrednosti homocisteina.<sup>7-9</sup>

Sprovedene su epidemiološke studije u kojima je ispitivan odnos povišenih vrednosti homocisteina i kardiovaskularnih bolesti (KVB). Na osnovu meta-analize 27 takvih studija, koje su obuhvatile više od 4000 pacijenata, procenjeno je da je povišena vrednost ukupnog homocisteina za 5 µmol/l povezana sa odnosom verovatnoće za koronarnu arterijsku bolest (KAB) od 1,6 (interval poverenja [IP] od 95%, 1,4 do 1,7 kod muškaraca i 1,8 (IP od 95% 1,3 do 1,9) kod žena; odnos verovatnoće za cerebrovaskularne bolesti iznosio je 1,5 (IP od 95% 1,3 do 1,9). Rizik kod povišene vrednosti ukupnog homocisteina za 5 µmol/l isti je kao i rizik kod povišene vrednosti holesterola za 0,5 mmol/l (20 mg/dl). Utvrđena je i jaka veza sa perifernom arterijskom bolešću.<sup>10</sup>

Hiperhomocisteinemija, povišena vrednost homocisteina, može se dovesti u vezu sa povećanim rizikom od KVB. Objavljen je i veliki broj izveštaja iz prospektivnih studija odnosa hiperhomocisteinemije i rizika od KVB kod prvobitno zdravih muškaraca i žena. Krajnje tačke bile su zasnovane na kardiovaskularnom događaju, poput akutnog infarkta miokarda, moždanog udara, KAB-a ili mortaliteta. Jedanaest takvih ugneždenih anamnestičkih studija koje je pregledao Kataneo<sup>11</sup> dale su dvosmislene rezultate, s obzirom da je u pet studija utvrđena veza sa rizikom, a u šest nije. Vrednosti homocisteina određivane su u skorijoj prospektivnoj studiji žena u postmenopauzi koje su učestvovala u Women's Health Study. Analiziran je homocistein iz uzoraka uzetih od 122 žene koje su kasnije imale kardiovaskularne događaje, i uzorci su poređeni sa kontrolnom grupom od 244 žene odgovarajućih godina starosti i pušačkog statusa. Kod žena iz kontrolne grupe bolest se nije razvila tokom trogodišnjeg kontrolnog perioda. Rezultati su pokazali da su žene u postmenopauzi koje su imale kardiovaskularne događaje imale značajno veće polazne vrednosti homocisteina. Kod žena čije su vrednosti bile u najvišem kvartilu postojao je dvostruko veći rizik od bilo kog kardiovaskularnog događaja. Pokazalo se da povišene polazne vrednosti homocisteina predstavljaju samostalan faktor rizika.<sup>12</sup> Pored toga, vrednosti homocisteina određivane su i kod 1933 starijih muškaraca i žena u kohorti framingamske studije srca, kada je pokazano da su povišene vrednosti homocisteina u samostalnoj vezi sa povećanim stopama mortaliteta od svih uzroka i KVB.<sup>13</sup>

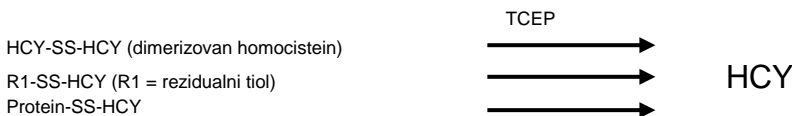
Kod pacijenata sa hroničnim oboljenjem bubrega beleže se povećani morbiditet i mortalitet usled arteriosklerotične KVB. U krvi ovih pacijenata često se javlja nalaz povišene koncentracije homocisteina. Iako takvi pacijenti imaju nedostatak pojedinih vitamina koji učestvuju u metabolizmu homocisteina, povišene vrednosti HCY prevashodno su uzrokovane slabijim uklanjanjem HCY iz krvi pomoću bubrega.<sup>14,15</sup>

Lekovi poput metotreksata, karbamazepina, fenitoina, azotsuboksida i 6-azauridin triacetata utiču na metabolizam HCY i mogu uzrokovati povišene vrednosti HCY.<sup>16</sup>

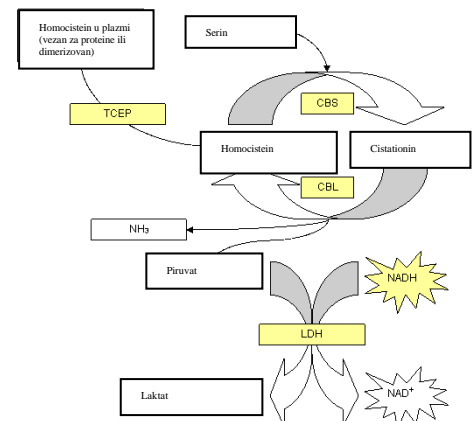
## OSNOVI ANALIZE

Vežan ili dimerizovan homocistein (u oksidisanom obliku) redukuje se do slobodnog homocisteina, koji stupa u reakciju sa serinom i uz katalizaciju cistationin beta-sintazom (CBS) nastaje cistationin. Cistationin se pomoću cistationin beta-lijaze (CBL) dalje razlaže na homocistein, piruvat i amonijak. Piruvat se potom pomoću laktat dehidrogenaze (LDH) pretvara u laktat sa nikotinamid adenin dinukleotidom (NADH) kao koenzimom. Stopa pretvaranja NADH u NAD<sup>+</sup> direktno je proporcionalna koncentraciji homocisteina (Δ A340 nm).

**Redukcija:** Dimerizovan homocistein, mešoviti disulfid i oblici u kojima je HCY vezan za proteine redukuju se pomoću tris [2-karboksietil] fosfina (TCEP) i nastaje slobodan HCY.



**Enzimsko pretvaranje:** Slobodan HCY pretvara se u cistationin pomoću cistationin beta-sintaze i viška serina. Cistationin se zatim razlaže na homocistein, piruvat i amonijak. Piruvat se pomoću laktat dehidrogenaze pretvara u laktat uz NADH kao koenzim. Stopa pretvaranja NADH u NAD<sup>+</sup> direktno je proporcionalna koncentraciji homocisteina (Δ A340 nm).



## DODATNE INFORMACIJE



Pošto kompanija Beckman Coulter ne proizvodi reagens niti obavlja kontrolu kvaliteta ili druge testove pojedinačnih serija, kompanija Beckman Coulter nije odgovorna za kvalitet dobijenih podataka koji je posledica radnih svojstava reagensa, razlika između serija reagenasa ili izmena protokola proizvođača.

## TEHNIČKA PODRŠKA

- Da biste dobili tehničku podršku, obratite se lokalnom predstavništvu kompanije Beckman Coulter.
- Oštećenja pri transportu - obavestite Centar za kliničku podršku kompanije Beckman Coulter ako primite oštećen proizvod.
- Uputstvo za upotrebu (uključujući prevode i parametre za izbegavanje unakrsne kontaminacije) potražite na adresi [www.homocysteine.org.uk/BCI](http://www.homocysteine.org.uk/BCI)

## INFORMACIJE ZA PORUČIVANJE I DELOVI KOMPLETA

Koristite sledeće šifre za poručivanje materijala od lokalnog predstavništva kompanije Beckman Coulter:

Šifra proizvoda	Opis	Sastav	Opasnost
B08176	REAG 1 - 1 x 30 ml Tečnost bez boje i mirisa	NADH (0,47 mM), LDH (38 KU/l), Serin (0,76 mM), Trizma baza 1-10%, Trizma hidrohlorid 1-10%, Natrijum azid < 1%. Reduktans (TCEP:2,9 mM) <b>Spreman za upotrebu</b>	
	REAG 2 - 1 x 5 ml Bledožuta tečnost bez mirisa	Ciklični enzimi CBS (0,748 KU/l) i CBL (16,4 KU/l) Natrijum azid < 1%. <b>Spreman za upotrebu</b>	
	CAL 0 µM - 1 x 3,0 ml, (plavi zatvarač), tečnost bez boje i mirisa	Prazan vodeni rastvor za homocistein (0 µmol/l). <b>Spreman za upotrebu</b>	
	CAL 28 µM - 1 x 3,0 ml, (crveni zatvarač), tečnost bez boje i mirisa	Vodeni rastvor homocisteina (28 µmol/l). <b>Spreman za upotrebu</b>	

Kalibratori se pripremaju gravimetrijski, sledljivi su po metodu NIST SRM 1955 i potvrđeni namenskim postupkom merenja (HPLC). Izmerene vrednosti su odštampane na etiketama (0 µmol/l i 28 µmol/l).

Za upotrebu sa sredstvom Liquid Stable (LS) 2-part Homocysteine Reagent, od kompanije Beckman Coulter može se poručiti i Homocysteine Control Kit (šifra proizvoda - B08177) koji sadrži kontrolne rastvore niske, srednje i visoke koncentracije.

## SKLADIŠTENJE I ISPORUKA REAGENASA



1. Delove kompleta čuvajte na temperaturi od 2 do 8 °C i koristite do isteka roka trajanja navedenog na etiketama. Nemojte koristiti reagense kojima je istekao rok trajanja.
2. Obavestite Centar za tehničku podršku kompanije Beckman Coulter ako primite oštećen proizvod.
3. Reagensi se mogu koristiti više puta do isteka roka trajanja navedenog na etiketama. Između svake upotrebe reagensi se **moraju** ponovo uskladištiti na temperaturi od 2 do 8 °C.
4. Nemojte mešati različite brojeve serija kompleta reagenasa.
5. **NEMOJTE ZAMRZAVATI REAGENSE.**
6. Nemojte izlagati materijal reagensa svetlosti.
7. Izbegavajte kontaminaciju reagenasa. Koristite novi vrh pipete za jednokratnu upotrebu svaki put kada rukujete reagensima ili uzorcima.
8. Čuvanje u instrumentu. Reagensi se mogu čuvati do 30 dana u instrumentu na svim AU platformama (AU400, AU480, AU680, AU5800 i DxC 700 AU).
9. Reagensi ne smeju sadržati čestice. Bacite ih ako postanu zamućeni.

## UPOZORENJA I MERE OPREZA

### Samo za upotrebu u in vitro dijagnostici

1. Strogo se pridržavajte uputstava iz ovog priručnika, naročito onih koja se odnose na uslove rukovanja i skladištenja.
2. Reagens br. 1 i reagens br. 2 sadrže natrijum azid, koji može da stupi u reakciju sa olovom ili bakrom u cevima, zbog čega mogu da nastanu izuzetno eksplozivni azidi metala. Prilikom odlaganja na otpad isperite velikom količinom vode kako bi se sprečilo nakupljanje azida.
3. Od proizvođača, Axis-Shield Diagnostics Ltd., mogu se na zahtev dobiti listovi sa podacima o bezbednosti materijala za sve delove koje ovaj komplet sadrži.

REAG 1 REAG 2	EUH032 - Kontakt sa kiseline oslobađa vrlo toksičnih gasova.
------------------	--

Opaz: Federalni zakon ograničava prodaju novog proizvoda za prodaju od strane liječnika ili po nalogu liječnika.

## PRIKUPLJANJE UZORAKA I RUKOVANJE UZORCIMA

1. Za određivanje homocisteina mogu se koristiti serum (prikupljen u serumsku epruvetu ili epruvetu za odvajanje seruma) i plazma (prikupljena u EDTA epruvetu sa kalijumom ili epruvetu sa litijum heparinom).  
Međutim, ne preporučuje se da se za istog pacijenta naizmenično koriste rezultati iz seruma, heparinizirane plazme i EDTA plazme.<sup>26</sup> Isto tako, zabeležene su i razlike u matricama između serumskih epruveta, epruveta za odvajanje seruma i epruveta za plazmu.<sup>18</sup>  
Da bi se povećanje koncentracije homocisteina usled stvaranja iz eritrocita svelo na minimum, obradite uzorke na sledeći način:  
- Nakon prikupljanja a pre obrade, sve uzorke (i serum i plazmu) stavite na led. Serum može sporije da se zgrušava i može se smanjiti zapremina.<sup>16</sup>  
- Svi uzorci se mogu držati na ledu do 6 časova pre odvajanja centrifugiranjem.<sup>16</sup>  
- Centrifugiranjem odvojite eritrocite od seruma ili plazme i prebacite uzorak u šoljicu za uzorak ili drugu čistu posudu.  
**Napomena:** Koncentracija homocisteina može se povećati od 10 do 20% u uzorcima koji se ne stave odmah na led.<sup>17</sup>
2. Ako planirate da analizirate uzorak u roku od 2 nedelje od prikupljanja, uzorak treba da se čuva na temperaturi od 2 do 8 °C. Ako će se analiza obaviti za više od 2 nedelje, uzorak treba čuvati u zamrznutom stanju na temperaturi od -20 °C ili niže. Pokazano je da su na temperaturi od -20 °C uzorci stabilni 8 meseci.<sup>16,18</sup>
3. Rukovalac je dužan da se postara da se u analizi Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent Assay koristi odgovarajuća vrsta, odnosno vrste uzoraka.
4. Pregledajte sve uzorke (uzorke, kalibratore i kontrolne rastvori) kako biste videli da li sadrže mehuriće. Uklonite mehuriće pre analize.
5. Uzorke koji sadrže čestice (fibrin, eritrocite ili druge čestice) i uzorke koji su vidno lipemični ne bi trebalo koristiti za analizu. Iz takvih uzoraka mogu se dobiti netačni rezultati.
6. Nakon odmrzavanja **temeljno** promešajte uzorke mešanjem u vorteks mešalici pri maloj brzini ili blagim okretanjem gore-dole da biste obezbedili dosledne rezultate. Izbegavajte ponovljeno zamrzavanje i odmrzavanje. Uzorci koji sadrže čestice ili eritrocite, kao i zamućeni uzorci moraju se centrifugirati pre analize.

## REZULTATI

Rezultati se izražavaju u  $\mu\text{mol/l}$ . Uzorke  $>44 \mu\text{mol/l}$  treba razblažiti u razmeri 1/3 uzorka i 2/3 kalibratora od 0  $\mu\text{mol/l}$  ili 1/10 uzorka i 9/10 kalibratora od 0  $\mu\text{mol/l}$ , u zavisnosti od slučaja. Vodite računa da pomnožite rezultate odgovarajućim faktorom razblaživanja.

## OČEKIVANE VREDNOSTI

**Referentni opseg:** Referentni opseg određuje svaka laboratorija zasebno kako bi se potvrdile karakteristike populacije koja se analizira. Sledeći podaci mogu se koristiti kao referentni dok laboratorija ne analizira dovoljan broj uzoraka i odredi svoj referentni opseg. Koncentracija HCY u plazmi ili serumu zdravih osoba varira u odnosu na godine starosti, pol, geografsko područje i genetske faktore. Referentne vrednosti prijavljene u naučnoj literaturi za odrasle žene i muškarce iznose od 5 do 15  $\mu\text{mol/l}$ , pri čemu muškarci imaju veće vrednosti od žena, a žene u postmenopauzi imaju veće vrednosti homocisteina od žena pre menopauze.<sup>16,19,20</sup> Uobičajeno je da vrednosti HCY rastu s godinama, pri čemu je referentni opseg među starijom populacijom ( $> 60$  godina) 5-20  $\mu\text{mol/l}$ .<sup>21</sup> U zemljama u kojima se koriste programi za pojačan unos folne kiseline mogu se uočiti manje vrednosti HCY.<sup>22,23</sup>

**Merljivi opseg:** Merljivi opseg analize Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent Assay iznosi 2-44  $\mu\text{mol/l}$ .

## OGRANIČENJA UPOTREBE

1. Za upotrebu u in vitro dijagnostici. Samo za profesionalnu upotrebu.
2. Linearni opseg analize Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent Assay kada se analiza obavlja prema uputstvu iznosi 2-44  $\mu\text{mol/l}$  za sve AU platforme. Uzorke  $> 44 \mu\text{mol/l}$  treba razblažiti u razmeri 1/3 uzorka i 2/3 kalibratora od 0  $\mu\text{mol/l}$  ili 1/10 uzorka i 9/10 kalibratora od 0  $\mu\text{mol/l}$ , u zavisnosti od slučaja.
3. Reagensi moraju biti bistri. Bacite ih ako postanu zamućeni.
4. Merenje homocisteina obuhvata i cistationin, ali vrednost cistationina u opštoj populaciji (0,065 do 0,3  $\mu\text{mol/l}$ ) ima zanemarljiv efekat. U izuzetno retkim slučajevima, poput krajnjeg stadijuma oboljenja bubrega i pacijenata sa teškim metaboličkim poremećajima, vrednost cistationina može biti znatno povišena i u teškim slučajevima interferencija može iznositi i više od 20%.<sup>24,25</sup>
5. Karbamazepin, metotreksat, fenitoin, azotsuboksid i 6-azauridin triacetat mogu da utiču na koncentraciju homocisteina.<sup>16</sup>
6. Napomena: Uzorci pacijenata koji su pod terapijom koja sadrži S-adenozil-metionin mogu da daju lažno povišene vrednosti homocisteina. Pacijenti koji uzimaju metotreksat, karbamazepin, fenitoin, azotsuboksid, antiepileptike ili 6-azauridin triacetat mogu imati povišene vrednosti homocisteina zbog uticaja pomenutih supstanci na metabolički put.
7. Uzorke koji sadrže čestice (fibrin, eritrocite ili druge čestice) i uzorke koji su vidno lipemični ne bi trebalo koristiti za analizu. Iz takvih uzoraka mogu se dobiti netačni rezultati.
8. Ograničenja: Hidroksilamin, koji je prisutan u nekim reagensima za gvožđe, može da se prenese (putem reakcionih sondi/miksera ili reakcionih kivet) i uzrokuje lažno niske rezultate. U većini slučajeva rutinski postupci ispiranja ne mogu da otklone ovaj problem (uključujući i reagens UIBC kompanije Beckman Coulter (br. dela OSR1205, koji sadrži hidroksilamin). Informacije o sprečavanju prenošenja na AU sistemima potražite u protokolu kompanije Axis Shield za sprečavanje kontaminacije. Postarajte se da primenite odgovarajuće parametre za sprečavanje kontaminacije. Parametre za sprečavanje kontaminacije za analizator možete dobiti od korisničke službe kompanije Axis Shield.
9. Para etanola može da se oslobodi iz reagensa **REAG 1** za određivanje homocisteina kada se nalazi postavljen na karusel za reagens BECKMAN COULTER AU serije analizatora. Izbegavajte upotrebu reagenasa etanola zajedno sa homocisteinom da biste izbegli potencijalnu kontaminaciju atmosferskim elementima.

## RADNA SVOJSTVA

### ZASNOVANA NA MERENJIMA NA AU PLATFORMAMA KOMPANIJE BECKMAN COULTER - AU400, AU480, AU680, AU5800 I DxC 700 AU

#### Tačnost

Sprovedeno je ispitivanje korelacije pomoću uzoraka plazme zdravih osoba. Svi uzorci analizirani su pomoću sredstva Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent u skladu sa dokumentom EP9-A2 instituta CLSI (zvanično NCCLS).<sup>27</sup> Svi rezultati su opisani pomoću intervala poverenja od 95%. Opsezi uzoraka i podataka dali su:

Metoda poređenja	Beckman Coulter AU400 naspram Catch Liquid Stable	Beckman Coulter AU480 naspram AU400	Beckman Coulter AU680 naspram AU400	Beckman Coulter AU5800 naspram AU400	Beckman Coulter DxC 700 AU naspram AU400
Broj uzoraka	94	99	98	99	94
Nagib linije regresije	0,99	0,97	0,97	0,98	0,99
Presek na y osi	0,17	-0,68	-0,22	-0,75	0,67
Koeficijent korelacije	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Opseg uzorka	6,5 – 49,0	8,5 – 45,1	8,5 – 45,1	8,5 – 45,1	5,8-45,9

### **Preciznost**

Ispitivanja na AU platformama (AU400, AU480, AU680, AU5800 i DxC 700 AU) sprovedena su u skladu sa smernicama datim u dokumentu EP5-A2 instituta CLSI (zvanično NCCLS).<sup>28</sup> Za svaki instrument analizirana su tri kontrolna rastvora HCY i tri uzorka humane plazme pomoću dve serije reagenasa, u dva replikata i dva odvojena termina dnevno tokom najmanje 5 dana. Ispod je dat kratak pregled rezultata:

#### **Beckman Coulter AU400**

Uzorak	n	Serija reagensa	Srednja vrednost	U okviru jedne obrade		Između različitih obrada		Ukupno	
				SD	%IP	SD	%IP	SD	%IP
Kontrola niske koncentracije	80	1	6,28	0,17	2,6	0,11	1,7	0,28	4,4
	80	2	6,29	0,13	2,1	0,11	1,7	0,26	4,1
Kontrola srednje koncentracije	80	1	12,33	0,18	1,5	0,15	1,2	0,37	3,0
	80	2	12,24	0,16	1,3	0,16	1,3	0,39	3,2
Kontrola visoke koncentracije	80	1	25,53	0,38	1,5	0,35	1,4	0,65	2,5
	80	2	25,27	0,41	1,6	0,00	0,0	0,73	2,9
Uzorak P1	80	1	6,67	0,13	1,9	0,00	0,0	0,23	3,3
	80	2	6,97	0,15	2,2	0,00	0,0	0,31	4,4
Uzorak P2	80	1	35,96	0,46	1,3	0,40	1,1	0,89	2,5
	80	2	35,53	0,40	1,1	0,23	0,7	0,82	2,3
Uzorak P3	80	1	48,31	0,53	1,1	0,42	0,9	0,97	2,0
	80	2	47,66	0,47	1,0	0,38	0,8	1,07	2,2

#### **Beckman Coulter AU480**

Uzorak	n	Serija reagensa	Srednja vrednost	U okviru jedne obrade		Između različitih obrada		Ukupno	
				SD	%IP	SD	%IP	SD	%IP
Kontrola niske koncentracije	20	1	6,73	0,07	1,1	0,17	2,6	0,21	3,1
	20	2	6,51	0,17	2,5	0,11	1,7	0,22	3,4
Kontrola srednje koncentracije	20	1	12,74	0,18	1,4	0,13	1,0	0,24	1,9
	20	2	12,43	0,22	1,8	0,17	1,3	0,30	2,4
Kontrola visoke koncentracije	20	1	26,13	0,24	0,9	0,11	0,4	0,46	1,8
	20	2	25,66	0,17	0,7	0,12	0,5	0,47	1,8
Uzorak P1	20	1	10,54	0,33	3,1	0,00	0,0	0,37	3,5
	20	2	11,00	0,71	6,5	0,00	0,0	0,92	8,4
Uzorak P2	20	1	28,71	0,24	0,9	0,18	0,6	0,58	2,0
	20	2	28,20	0,18	0,6	0,12	0,4	0,60	2,1
Uzorak P3	20	1	37,63	0,32	0,9	0,18	0,5	0,97	2,6
	20	2	36,98	0,21	0,6	0,12	0,5	0,91	2,5

#### **Beckman Coulter AU680**

Uzorak	n	Serija reagensa	Srednja vrednost	U okviru jedne obrade		Između različitih obrada		Ukupno	
				SD	%IP	SD	%IP	SD	%IP
Kontrola niske koncentracije	20	1	6,96	0,16	2,4	0,00	0,0	0,16	2,4
	20	2	6,79	0,16	2,3	0,02	0,3	0,21	3,1
Kontrola srednje koncentracije	20	1	13,03	0,12	1,0	0,15	1,2	0,20	1,5
	20	2	12,76	0,20	1,6	0,05	0,4	0,22	1,7
Kontrola visoke koncentracije	20	1	26,38	0,23	0,9	0,28	1,0	0,41	1,6
	20	2	26,19	0,31	1,2	0,24	0,9	0,40	1,5
Uzorak P1	20	1	10,76	0,30	2,8	0,00	0,0	0,32	3,0
	20	2	10,65	0,32	3,0	0,00	0,0	0,39	3,6
Uzorak P2	20	1	28,90	0,34	1,2	0,15	0,5	0,48	1,6
	20	2	28,67	0,42	1,5	0,06	0,5	0,73	2,5
Uzorak P3	20	1	37,78	0,28	0,7	0,16	0,4	0,51	1,4
	20	2	37,90	0,28	0,7	0,11	0,3	0,67	1,8

#### **Beckman Coulter AU5800**

Uzorak	n	Serija reagensa	Srednja vrednost	U okviru jedne obrade		Između različitih obrada		Ukupno	
				SD	%IP	SD	%IP	SD	%IP
Kontrola niske koncentracije	20	1	6,49	0,24	3,6	0,00	0,0	0,30	4,7
	20	2	6,70	0,13	2,2	0,07	1,1	0,16	2,7
Kontrola srednje koncentracije	20	1	12,52	0,23	1,8	0,00	0,0	0,23	1,8
	20	2	12,57	0,17	1,4	0,19	1,5	0,26	2,1
Kontrola visoke koncentracije	20	1	25,87	0,26	1,0	0,32	1,2	0,41	1,6
	20	2	25,69	0,30	1,2	0,16	0,6	0,34	1,3
Uzorak P1	20	1	10,53	0,16	1,5	0,00	0,0	0,35	3,3
	20	2	10,53	0,27	2,6	0,00	0,0	0,34	3,2
Uzorak P2	20	1	28,58	0,22	0,8	0,24	0,8	0,52	1,8
	20	2	28,42	0,29	1,0	0,07	0,3	0,49	1,7
Uzorak P3	20	1	37,67	0,35	0,9	0,27	0,7	0,79	2,1
	20	2	37,55	0,29	0,8	0,26	0,7	0,55	1,5

**Beckman Coulter DxC 700 AU**

Uzorak	n	Serija reagensa	Srednja vrednost	U okviru jedne obrade		Između različitih obrada		Ukupno	
				SD	%CV	SD	%CV	SD	%CV
Kontrola niske koncentracije	80	1	5.77	0.1	1.7	0.0	0.0	0.3	5.1
	80	2	5.83	0.1	2.1	0.1	1.6	0.3	4.8
Kontrola srednje koncentracije	80	1	11.72	0.1	1.1	0.0	0.0	0.4	3.0
	80	2	11.72	0.2	1.4	0.0	0.0	0.4	3.6
Kontrola visoke koncentracije	80	1	23.34	0.2	0.9	0.0	0.0	0.6	2.4
	80	2	23.45	0.2	0.8	0.1	0.5	0.6	2.7
Uzorak P1	80	1	10.54	0.2	2.2	0.2	1.7	0.4	3.9
	80	2	10.63	0.2	2.2	0.2	2.2	0.4	4.1
Uzorak P2	80	1	29.16	0.5	1.5	0.2	0.6	0.7	2.5
	80	2	29.12	0.5	1.6	0.3	1.1	0.8	2.8
Uzorak P3	80	1	38.20	0.5	1.2	0.2	0.6	0.9	2.2
	80	2	38.16	0.6	1.5	0.0	0.0	1.0	2.6

**Linearnost razblaživanja**

Linearnost razblaživanja u analizi Liquid Stable (LS) 2-Part Homocysteine Reagent Assay na AU platformama kompanije Beckman daje procenat (%) oporavka od  $100 \pm 10\%$  za sve uzorke u čitavom opsegu analize. Uzorci  $>44 \mu\text{mol/l}$  imaju srednju vrednost oporavka od  $100\% \pm 11\%$  za sve očekivane rezultate kada se razblaže u opsegu analize.

**Granica detekcije**

Granica detekcije svakog sistema utvrđena je u skladu sa dokumentom EP17-A instituta CLSI (zvanično NCCLS).<sup>29</sup> Vrednosti granice detekcije ( $\mu\text{mol/l}$ ) prikazane su u sledećoj tabeli:

Beckman Coulter AU400	Beckman Coulter AU480	Beckman Coulter AU680	Beckman Coulter AU5800	Beckman Coulter DxC 700 AU
0,33	0,39	0,54	0,59	1,04

**Analitička specifičnost**

Analitička specifičnost procenjena je samo na platformi AU400 kompanije Beckman Coulter u skladu sa smernicama datim u dokumentu EP7-A2<sup>30</sup> instituta CLSI za interferentne supstance navedene u sledećoj tabeli:

Interferentna supstanca	Koncentracija interferentne supstance	% interferencije
Bilirubin	20 mg/dl	$\leq +10$
Hemoglobin	500 mg/dl	$\leq +10$
Eritrociti	0,4%	$\leq +10$
Trigliceridi	500 mg/dl	$\leq +10$
Glutation	1000 $\mu\text{mol/l}$	$\leq +10$
Metionin	800 $\mu\text{mol/l}$	$\leq +10$
L-cistein	200 $\mu\text{mol/l}$	$\leq +10$
Piruvat	1250 $\mu\text{mol/l}$	$\leq +10$

Nijedna od ovih supstanci nije prikazala značajnu interferenciju pri analizi.

Uzorci sa povišenim vrednostima proteina prikazuju razliku  $>10\%$  u poređenju sa rezultatima normalnih uzoraka, te bi ih trebalo izbegavati.

Informacije o mogućoj interferenciji izazvanoj lekovima, bolestima ili predanalitičkim varijablama pročitajte u referenci br. 16 navedenoj u odeljku sa referencama u ovom priručniku.

**Prenošenje uzorka**

Ispitivanja prenošenja uzorka na svim ispitanim AU platformama pokazala su da je prenošenje manje od granice detekcije analize.

**Stabilnost reagensa u instrumentu**

Reagensi su stabilni do 30 dana na svim AU platformama.

**Stabilnost kalibracije**

Potvrđeno je da je kriva kalibracije stabilna do 30 dana na platformi AU400 kompanije Beckman Coulter i do 14 dana na platformama AU5800 i DxC 700 AU kompanije Beckman Coulter.

**Vrste uzoraka**

Za upotrebu su odobrene sledeće epruvete za uzimanje uzoraka: epruvete za plazmu sa EDTA i litijum heparinom, serumska epruveta i epruveta za odvajanje seruma. Druge epruvete za uzimanje uzoraka nisu ispitane.

Za određivanje homocisteina mogu se koristiti serum (prikupljen u serumsku epruvetu ili epruvetu za odvajanje seruma) i plazma (prikupljena u EDTA epruvetu sa kalijumom ili epruvetu sa litijum heparinom). Rukovalac je dužan da se postara da se koriste odgovarajuće epruvete. Međutim, ne preporučuje se da se za istog pacijenta naizmenično koriste rezultati iz seruma, heparinizirane plazme i EDTA plazme.<sup>26</sup> Isto tako, zabeležene su i razlike u matricama između serumskih epruveta, epruveta za odvajanje seruma i epruveta za plazmu.<sup>18</sup>

# ANALITIČKI PROTOKOL ZA AU PLATFORMES – AU400, AU480, AU680, AU5800 I DxC 700 AU

Postarajte se da parametri analize u potpunosti odgovaraju dole navedenim parametrima.

## AU400 – PARAMETRI POSTUPKA

Br. analize [*]	Naziv [HCY]	Tip [Ser.]	
Zapremina uzorka:	[16,5] µl	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Faktor pred razblaživanja:	[1]		
Zapremina reagensa br. 1:	[250] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Zapremina reagensa br. 2:	[25] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Talasna dužina prim.:	[340] nm		
Talasna dužina sek.:	[380] nm		
Metoda reakcije:	RATE1		
Nagib reakcije	[-]		
1. tačka	Prva [15]		
	Poslednja [27]		
2. tačka	Prva [ ]		
	Poslednja [ ]		
Linearnost	[100]%		
Bez vremena odlaganja	[Ne]		
Min. optička gustina		Maks. optička gustina	
L [-2,0]		H [2,5]	
Granica optičke gustine reagensa	Prva L [ ]	Prva H [ ]	
	Poslednja L [ ]	Poslednja H [ ]	
Dinamički opseg:	L [2,0]	H [44,0]	
Faktor korelacije:	A [1,0]	B [0,0]	
Period stabilnosti u instrumentu:		[30]	
Kalibracija:			
	Tačka	Optička gustina	Konc.
	1 [*]	[ ]	[0,0]
	2 [*]	[ ]	[**]
	Tip kalibracije:		[AA]
	Formula:	[Y=AX+B]	

\*Definiše korisnik \*\*Unesite vrednosti sa bočica kalibratora

## AU480 / AU680 – PARAMETRI POSTUPKA

Br. analize [*]	Naziv [HCY]	Tip [Ser.]	
Zapremina uzorka:	[10] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Faktor pred razblaživanja:	[1]		
Zapremina reagensa br. 1:	[155] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Zapremina reagensa br. 2:	[16] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Talasna dužina prim.:	[340] nm		
Talasna dužina sek.:	[380] nm		
Metoda reakcije:	RATE1		
Nagib reakcije	[-]		
1. tačka	Prva [15]		
	Poslednja [27]		
2. tačka	Prva [ ]		
	Poslednja [ ]		
Linearnost	[25]%		
Bez vremena odlaganja	[Da]		
Min. optička gustina		Maks. optička gustina	
L [...]		H [...]	
Granica optičke gustine reagensa	Prva L [-2,0]	Prva H [2,5]	
	Poslednja L [-2,0]	Poslednja H [2,5]	
Dinamički opseg:	L [2,0]	H [44,0]	
Faktor korelacije:	A [1,0]	B [0,0]	
Period stabilnosti u instrumentu:		[30]	
Provera uticaja LIH-a		[Ne]	
Kalibracija:			
	Tačka	Optička gustina	Konc.
	1 [*]	[ ]	[0,0]
	2 [*]	[ ]	[**]
	Tip kalibracije:		[AA]
	Formula:	[Y=AX+B]	
Stabilnost	Prazan reagens [30] dana	Kalibracija [14] dana	

\*Definiše korisnik \*\*Unesite vrednosti sa bočica kalibratora

**AU5800 – PARAMETRI POSTUPKA**

Br. analize [*]	Naziv [HCY]	Tip [Ser.]	
Zapremina uzorka:	[7,5] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Faktor pred razblaživanja:	[1]		
Zapremina reagensa br. 1:	[115] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Zapremina reagensa br. 2:	[12] µL	Zapremina razblaživača:	[0,0] µl
Talasna dužina prim.:	[340] nm		
Talasna dužina sek.:	[380] nm		
Metoda reakcije:	RATE1		
Nagib reakcije	[-]		
1. tačka	Prva [15]		
	Poslednja [27]		
2. tačka	Prva [ ]		
	Poslednja [ ]		
Linearnost	[25]%		
Bez vremena odlaganja	[Da]		
Min. optička gustina		Maks. optička gustina	
L [ ]		H [ ]	
Granica optičke gustine reagensa	Prva L [-2,0]	Prva H [2,5]	
	Poslednja L [-2,0]	Poslednja H [2,5]	
Dinamički opseg:	L [2,0]	H [44,0]	
Faktor korelacije:	A [1,0]	B [0,0]	
Period stabilnosti u instrumentu:		[30]	
Provera uticaja LIH-a		[Ne]	
Kalibracija:			
	Tačka	Optička gustina	Konc.
	1 [*]	[ ]	[0,0]
	2 [*]	[ ]	[**]
	Tip kalibracije:		[AA]
	Formula:	[Y=AX+B]	
Stabilnost	Prazan reagens [30] dana	Kalibracija [14] dana	

\*Definiše korisnik \*\*Unesite vrednosti sa bočica kalibratora













**DxC 700 AU - PARAMETRI POSTUPKA TESTIRANJA**

Naziv testa	Naziv [HCY1G]	ID reagensa [225]	
Zapremina uzorka:	[10] µL	Razblaživač	[0,0] µl
Faktor za unapred razblažene uzorke:	[1]		
Zapremina reagensa br. 1 (R1):	[155] µl	Razblaživač	[0,0] µl
Zapremina reagensa br. 2 (R2):	[16] µl	Razblaživač	[0,0] µl
Talasna dužina prim.:	[340] nm		
Talasna dužina sek.:	[380] nm		
Metoda reakcije:	RATE1		
Nagib reakcije	[-]		
Tačka merenja-1	Prva [15]	Poslednja [27]	
Tačka merenja-2	Prva [ ]	Poslednja [ ]	
Linearnost	[25]%		
Provera vremena odlaganja	[Da]		
Min. optička gustina	[-2,0]	Maks. optička gustina	[3,0]
Granica optičke gustine reagensa	Prva C [-2,0]	C [2,5]	
	Poslednja L [-2,0]	C [2,5]	
Analitički opseg merenja	C* [2,0]	C* [44,0]	
Faktor korelacije:	A [1]	B [0]	
Period stabilnosti u instrumentu:		[30]	
Provera uticaja lipemije, ikterusa i hemolize (LIH):		[Ne]	
Vrednost/oznaka	[Vrednost]		
Niska	[-9999999]	Visoka	[9999999]
Kritične granice	Niska [-9999999]	Visoka [9999999]	Jedinica [µmol/l]
Broj decimala	[1]		
Naziv testa:	HCY1G]	HCY1G]	[Serum]
Tip kalibracije	[AA]	Formula	[Y=AX+B]
Vrednosti	[2]		
Tačka-1	[Kal.0]	Konc. [0]	Niska [9999999] Visoka [9999999]
Tačka-1	[Kal.28]	Konc. [28]	Niska [9999999] Visoka [9999999]
Provera nagiba	[Nema]	Postupak napredne kalibracije	[Ne]
Stabilnost - prazan reagens	[30] dan	[0] čas	

\* Vrednosti podešene za izražavanje u µmo

## REFERENCE

1. McCully KS. Vascular Pathology of Homocysteinemia: Implications for the Pathogenesis of Arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-122
2. Malinow MR. Plasma Homocyst(e)ine and Arterial Occlusive Diseases: A Mini-Review. *Clin Chem* 1995;41:173-176
3. Ueland PM. Homocysteine Species as Components of Plasma Redox Thiol Status. *Clin Chem* 1995;41:340-342
4. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, *et al.* Prospective Study of Serum Total Homocysteine Concentration and Risk of Stroke in Middle-aged British Men. *The Lancet* 1995;346:1395-1398
5. Finkelstein JD. Methionine Metabolism in Mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-237
6. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of Transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, *et al.*, eds *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 1995;1279-1327
7. Clarke R, Daly L, Robinson K, *et al.* Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-1155
8. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, *et al.* Common Mutation in Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Circulation* 1996;94:3074-3078
9. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, *et al.* Genetic Polymorphism of Methylenetetrahydrofolate Reductase and Myocardial Infarction. *Circulation* 1996;94:1812-1814
10. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, *et al.* A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease. *JAMA* 1995;274:1049-1057
11. Cattaneo M. Hyperhomocysteinemia, Artherosclerosis and Thrombosis. *Thromb Haemost* 1999;81:165-176
12. Ridker PM, Manson JE, Buring JE, *et al.* Homocysteine and Risk of Cardiovascular Disease Among Postmenopausal Women. *JAMA* 1999;281:1817-1821
13. Bostom AG, Silbershatz H, Rosenberg IH, *et al.* Nonfasting Plasma Total Homocysteine Levels and All-Cause and Cardiovascular Disease Mortality in Elderly Framingham Men and Women. *Arch Intern Med* 1999;159:1077-1080
14. Guttormsen AB, Svarstad E, Ueland PM, *et al.* Elimination of Homocysteine from Plasma in Subjects with Endstage Renal Failure. *Irish J Med Sci* 1995;164 (Suppl. 15):8-9
15. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in End-stage Renal Disease: Prevalence, Etiology, and Potential Relationship to Arteriosclerotic Outcomes. *Kidney Int* 1997;52:10-20
16. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, *et al.* Total Homocysteine in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-1779
17. Ueland PM, Refsum H. Plasma Homocysteine, A Risk Factor for Vascular Disease: Plasma Levels in Health, Disease, and Drug Therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-501
18. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, *et al.* Homocysteine and Other Thiols in Plasma and Urine: Automated Determination and Sample Stability. *Clin Chem* 1993;39:263-271
19. Nehler MR, Taylor LM Jr, Porter JM. Homocysteinemia as a Risk Factor for Atherosclerosis: A Review. *Cardiovascular Pathol* 1997;6:1-9
20. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, *et al.* Plasma Total Homocysteine in Healthy Subjects: Sex-Specific Relation with Biological Traits. *Am J Clin Nutr* 1996;64:587-593
21. Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, *et al.* Variability and Determinants of Total Homocysteine Concentrations in Plasma in an Elderly Population. *Clin Chem* 1998;44:102-107
22. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, *et al.* The Effect of Folic Acid Fortification on Plasma Folate and Total Homocysteine Concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449-1454
23. Lawrence JM, Petitti DB, Watkins M and Umekubo MA. Trends in Serum Folate after Food Fortification. *The Lancet* 1999;354:915-916
24. Herrmann W, Schorr H, Obeid R, *et al.* Disturbed Homocysteine and Methionine Cycle Intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are Related to Degree of Renal Insufficiency in Type 2 Diabetes. *Clin Chem* 2005;51:1-7
25. Obeid R, Kuhlmann MK, Kohler H, *et al.* Response of Homocysteine, Cystathionine, and Methylmalonic Acid to Vitamin Treatment in Dialysis Patients. *Clin Chem* 2005;51:196-201
26. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, *et al.* Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. *Clin Chem* 2004;50(1):3-32
27. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method Comparison and Bias Estimation using Patient Samples; Approved Guideline-Second Edition*. NCCLS document EP9-A2. Wayne, PA: NCCLS, 2002
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition*. NCCLS Document EP5-A2, Wayne, PA: NCCLS, 2004
29. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Protocols for the Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline*. NCCLS Document EP17-A. Wayne, PA: NCCLS, 2004.
30. Clinical Laboratory Standards Institute. *Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition*. CLSI Document EP7-A2. Wayne, PA: CLSI, 2005.

	Medicinsko sredstvo za <i>in vitro</i> dijagnostiku		Čuvati na temperaturi od 2 do 8 °C
	Šifra proizvoda		Proizvođač
	Broj serije		Čuvati na tamnom mestu
	100 testova		Reagens 1, 2
	Pogledajte uputstvo za upotrebu		Kalibrator 0 µmol/l, kalibrator 28 µmol/l
	Rok upotrebe		Axis-Shield Diagnostics Ltd., The Technology Park, Dundee, DD2 1XA, UK Tel: +44 (0) 1382 422000 Faks: +44 (0) 1382 422088
<b>Rx Only</b>	Za samo Recept korištenja		

Beckman Coulter i AU su zaštitni znaci Beckman Coulter, Inc. i upisuju se u USPTO. Svi ostali zaštitni znakovi su vlasništvo njihovih vlasnika.