

НАБОР

ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОБЩЕГО L-ГОМОЦИСТЕИНА В ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ИЛИ ПЛАЗМЕ

FHCY100, Homocysteine EIA

Каталог. № : **FHCY100**
Производитель: **Axis-Shield**
(Великобритания)

Методика от **11-2011**



Основой при проведении анализа является оригинал инструкции на английском языке, вложенной в набор. Номер и дата версии оригинала и перевода инструкции должны совпадать.

Назначение

Данная тест-система предназначена для количественного определения общего L-гомоцистеина в человеческой сыворотке или плазме. Задачей данного анализа является диагностика и контроль лечения пациентов с предполагаемыми гипергомоцистеинемией и гомотеинурией.

Описание метода

Гомоцистеин – аминокислота, содержащая тиоловую группу. Ее синтез происходит в результате внутриклеточного деметилирования метионина. **Гомоцистеин (Hcy)** превращается в цистеин в необратимой каталитической реакции, зависящей от витамина B₆. Большая часть гомоцистеина реметилюруется в метионин, главным образом, фолат - кобаламин-зависимыми ферментами синтеза метионина. Гомоцистеин накапливается в клетках и выводится в циркуляцию в результате повреждения этих механизмов. Гомоцистеин циркулирует в плазме чаще всего в окисленной форме (т.е., в форме цистина и цистеин- Hcy дисульфида) и в связанном с белками виде. Также в небольшом количестве в циркуляции находятся восстановленный гомоцистеин и дисульфид гомоцистеина (Hcy SS- Hcy). Общий гомоцистеин (tHcy) – это сумма свободного и белок-связанного гомоцистеинов.

Сильное повышение концентрации Hcy наблюдается у людей с редкими генетическими дефектами ферментов, включенных в метаболизм Hcy. У пациентов с гомотеинурией находят задержку умственного развития, ранний артериосклероз, артериальную и венозную тромбоэмболию. Также найдены другие, менее резко выраженные генетические нарушения, которые вызывают умеренное повышение Hcy.

Эпидемиологические исследования включали изучение взаимосвязи между уровнем Hcy в крови и сердечно-сосудистыми заболеваниями (CVD). В результате 27-ми эпидемиологических исследований, в которые было включено более четырех тысяч пациентов, установлено, что рост уровня Hcy на 5 мкмоль/л коррелировал с повышением вероятности заболевания коронарных артерий в 1,6 раза (в 1,4-1,7 раза, с 95%-м доверительным интервалом (CI)) для мужчин и в 1,8 раза (в 1,3-1,9 раза, с 95%-м CI) для женщин. Эта же величина повышения концентрации Hcy приводила к частоте встречаемости цереброваскулярной патологии в 1,5 раза (в 1,3-1,9 раза, с 95%-м CI) и повышала риск развития болезни также, как и рост концентрации холестерина на 0,5 ммоль/л. Частота заболеваний периферических сосудов также имела сильную взаимосвязь с повышением уровня гомоцистеина.

У пациентов с хроническими заболеваниями почек отмечены высокие заболеваемость и смертность от причин, связанных с атеросклерозом CVD. Повышение концентрации Hcy в крови часто наблюдается у этих пациентов. Хотя у них может быть недостаток какого-нибудь из витаминов, включенных в метаболизм Hcy, основной причиной роста уровня гомоцистеина у этих больных является нарушение удаления его из крови почками^{10,11}. Некоторые лекарственные средства могут повышать уровень tHcy - оксид азота, метотрексат, изониазид, пеницилламин, антиконвульсанты и различные антиэпилептики¹.

Принцип метода

Тест-система предназначена для определения гомоцистеина в крови методом иммуноферментного анализа. Связанный с белком Hcy восстанавливается до свободного и превращается в S-аденозил-L-гомоцистеин (SAH) ферментативным путем в специальной процедуре, предшествующей иммуноанализу.¹⁴ Фермент

специфичен для L-формы гомоцистеина, в которой последний и присутствует в крови.

Восстановление

Смесь дисульфида и белок-связанной формы Hcy в образце восстанавливаются до свободного гомоцистеина при использовании дитиотреитола (DTT).

Белок-SS- Hcy DTT

*R1-SS- Hcy Hcy, где *R1 – любая тиоловая группа
Hcy-SS- Hcy

Ферментативная реакция

Гомоцистеин образца превращается в S - аденозил-L-гомоцистеин с использованием SAH-гидролазы в присутствии избытка аденозина (Ad).

Hcy + Ad SAH + H₂O

Иммуноферментный анализ

Следующий твердофазный иммуноферментный анализ основан на конкуренции между SAH в образце и SAH, иммобилизованным в ячейках планшета, за сайты связывания с моноклональными анти-SAH антителами. После удаления анти-SAH антител, не связанных с планшетом, добавляются вторые кроличьи антимышиные антитела, меченые пероксидазой хрена. Активность пероксидазы измеряется на спектрофотометре после добавления субстрата.

Полученная абсорбция обратно пропорциональна концентрации общего гомоцистеина в пробе.

Предосторожности

1. Данный набор предназначен только для диагностики *in vitro*.
2. Набор предназначен только для определения L-гомоцистеина, но не D-гомоцистеина.
3. Реагент F содержит мышиные антитела. Реагент G содержит кроличьи антитела.
4. Реагент D содержит 0,15% мертиолят (≤ 0,074% ртути). Обращаться с осторожностью.
5. Компоненты набора содержат материалы человеческого происхождения, которые протестированы на отсутствие антител к гепатиту В, С, ВИЧ 1 и ВИЧ-2. Однако ни один метод не может гарантировать, что продукты человеческого происхождения не инфицированы. Следовательно, с реагентами и образцами сыворотки следует обращаться как с потенциально инфекционно опасными.
6. Некоторые реагенты содержат раствор азид натрия (NaN) в качестве консерванта. Азид натрия может вступать в реакцию со свинцом и медью водопроводных труб с образованием взрывчатых азидов металлов. Смыть реагенты большим количеством воды для предотвращения образования азидов.
7. 0,01% мертиолят содержится в некоторых реагентах как консервант. Каждый набор содержит менее 0,028% ртути. Обращаться с осторожностью.
8. Не смешивайте реагенты из различных лотов.
9. Не используйте для работы тест-систему с истекшим сроком годности (указан на упаковке).

Реагенты

Набор Гомоцистеина FHCY100, 96 лунок

Компоненты набора	Раствор	Описание компонента	Объем
Реагент А	Рабочий буфер	Фосфатный буфер, азид натрия	54 мл
Реагент В	Аденозин/DTT	Аденозин/дитиотреитол, лимонная кислота	3,5 мл
Реагент С	SAH-гидролаза	Рекомбинантная S-аденозил-L-гомоцистеин гидролаза, трисбуфер, глицерин, метилпарабен	3,5 мл
Реагент D	Ферментный ингибитор	Метиолят, фосфатный буфер	55 мл
Реагент E	Диаминаз а адеозина	Диаминаз а адеозина, фосфатный буфер, азид натрия, BSA, фенол – красный краситель	55 мл
Реагент F	a-SAH антитело	Моноклонально мышиное анти-S-аденозил-L-гомоцистеин антитело, BSA, мертиолят	25 мл
Реагент G	Ферментный конъюгат	Кроличье анти-мышинного антитела ферментный конъюгат, пероксидаза хрена	15 мл
Реагент H	Субстратный раствор	N-метил-2-пурролидон, пропиленгликоль	15 мл

Реагент S	Стоп раствор	0.8 М Серной кислоты	20 мл
Промывочный буфер	Промывочный буфер	Фосфатный буфер, мертиолат, Твин 20, BSA	60 мл
Калибраторы 1-6	Калибраторы	Рекомбинантный S-аденозил-L-гомоцистеин (2, 4, 8, 15, 30,50 мкмоль/л) в буфере с консервантом	6x1.5 мл
Микротитровальные полоски	Микротитровальные полоски	Покрытые рекомбинантным S-аденозил-L-гомоцистеином	12x8 лунок

Промывочный буфер – это концентрат. И поэтому его необходимо развести (1+9) с очищенной водой перед использованием. Все остальные компоненты готовы к использованию.

Набор контролей гомотеина FHCY200

Компоненты набора	Описание компонента	Объем
Низкий контроль	7.0 мкмоль/л гомотеина в разбавленных образцах сыворотки человеческого происхождения, фосфатный буфер и консервант	1.5 мл
Средний контроль	12.5 мкмоль/л гомотеина в разбавленных образцах сыворотки человеческого происхождения, фосфатный буфер и консервант	1.5 мл
Высокий контроль	25.0 мкмоль/л гомотеина в разбавленных образцах сыворотки человеческого происхождения, фосфатный буфер и консервант	1.5 мл

Все контроли готовы к использованию.

Промывочный буфер для набора Гомотеина FHCY050

Компоненты набора	Описание компонента	Объем
Промывочный буфер	Фосфатный буфер, мертиолат, Твин 20, BSA	1000 мл

Промывочный буфер – это концентрат. И поэтому его необходимо развести (1+9) с очищенной водой перед использованием.

Материалы, необходимые, но не входящие в состав набора

- Контроль гомотеина (подробнее смотри раздел "Контроль качества")
- Пластиковые или стеклянные пробирки для предварительной обработки образцов
- Пипетки на 25, 100, 200, 500 мкл и 8-канальная пипетка на 100-200 мкл
- Мерная посуда на 50 и 600 мл
- Инкубатор на 37°C
- Вошер и ридер для планшетов

Приготовление и хранение компонентов набора

1. Все реагенты тест-системы должны храниться в холодильнике при 2-8 °С. Реагенты стабильны до истечения срока, указанного на коробке при условии хранения и использования в соответствии с инструкцией. Открытые реагенты стабильны в течение 12 недель при 2-8 °С и использования в соответствии с инструкцией.
2. Раствор для предварительной обработки образцов сыворотки или плазмы (SPS) готовится смешиванием реагентов А, В и С (смотри инструкцию, раздел 9). Раствор SPS стабилен в течение 1 часа и готовится заново для каждой серии анализа.
3. Промывочный буферный раствор разводится 1:10 дистиллированной водой перед использованием. Разведенный раствор стабилен в течение 4-х недель при комнатной температуре (18-25°C).
4. Реагенты D и H (в темных флаконах) хранить в темноте.
5. Необходимо, чтобы стрипы хранились в сухом месте (в пакете имеются капсулы с осушителем) и прохладном месте. Перед использованием пакет со стрипами выдержать не менее 2-х часов при комнатной температуре, не открывая пакета.
6. Только необходимое для анализа количество стрипов установите в рамку. Оставшиеся стрипы верните в пакет с осушителем и плотно закройте.
7. Остерегайтесь оставлять компоненты набора при температуре, превышающей 37°C – это может привести к денатурации ферментов.

Сбор и подготовка образцов

В данном анализе могут быть использованы ЭДТК-плазма или сыворотка.

Так как синтез гомотеина происходит в эритроцитах и после забора крови, очень важно подготовить образцы как описано ниже:

- Дать образцам свернуться в течение не более 30 минут перед центрифугированием и отделением сыворотки. Образцы сыворотки хранить охлажденными перед разделением.
- Образцы ЭДТК-плазмы центрифугировать или охладить сразу же после забора. ЭДТК-плазма может храниться охлажденной до 6 часов перед центрифугированием.

Прием пищи может повлиять на уровни гомотеина. Пища, богатая на протеины, дает повышенные уровни гомотеина и ее приема следует избегать.

Перед использованием образцы тщательно перемешать.

Образцы плазмы или сыворотки хранить при 2-8 °С в течение 12 недель, до 3 недель при комнатной температуре и до 8 месяцев замороженными.

Ограничения

- Если используется автоматический вошер, необходима очень тщательная промывка после Реагента G (голубого) – слабым раствором кислоты после воды. Любой оставшийся раствор в емкости интерферирует с последующим шагом анализа – добавлением Реагента H (субстратного раствора).
- Процедура промывки принципиальна для получения точного результата. При ручной промывке промыть нужно 4 раза по 350 мкл вместо 3 раз по 400 мкл. После промывки осушите планшет на фильтровальной бумаге.
- Не ставьте набор при температуре, превышающей 37°C – ферменты могут денатурировать.
- У пациентов, получающих в качестве лекарства S-аденозил-метионин, могут быть ложно завышенные результаты концентрации гомотеина.
- Образцы пациентов, недавно получавших препараты мышинных моноклональных антител в диагностических или лечебных целях, могут содержать человеческие антимышинные антитела (НАМА). НАМА, присутствующие в сыворотке или плазме, могут помешать иммуноанализу, в котором используются мышинные моноклональные антитела. Такие образцы не анализируются в данном методе.
- Клинические ограничения зависят от метаболических влияний. Образцы от пациентов, получающих препараты метотрексата, карбамазепина, фенитоина, оксида азота, антиконвульсанты и 6-азауридин триацетата, могут иметь повышенный уровень гомотеина в результате метаболической интерференции этих препаратов с метаболизмом гомотеина.

Процедура анализа

Все реагенты и планшет перед анализом должны быть доведены до комнатной температуры. Рекомендуется анализировать калибраторы в дублях, и использовать новую калибровочную кривую в каждой серии анализа.

Предварительная обработка образцов

1. Раствор для предварительной обработки образцов (SPS) готовится за 1 час до начала анализа. Объем, необходимый для обработки 10 образцов (для другого количества образцов необходимо рассчитать объем SPS).

Смешать указанные реагенты:

4,5 мл Реагента А
0,25 мл Реагента В
0,25 мл Реагента С

2. Развести калибраторы и образцы/контроли в пластиковых или стеклянных пробирках следующим образом:
25 мкл калибраторов/образцов/контролей + 500 мкл SPS
Инкубировать 30 минут при 37°C. Закрыть пробирки на время инкубации крышечками или парафильмом.
Перед шагом 3 данной процедуры образцы должны быть охлаждены.
3. Добавить 500 мкл Реагента D. Встряхните пробирки для перемешивания. Инкубировать 15 минут при 18-25°C.
4. Добавить 500 мкл Реагента E. Встряхните пробирки для перемешивания
Инкубировать 5 минут при 18-25°C.

Анализ на планшете

5. Внесите по 25 мкл разведенных калибраторов/образцов/контролей после шага 4 в лунки, покрытые SAH-антителами.
6. Добавьте 200 мкл Реагента F в каждую лунку. Инкубируйте 30 минут при 18-25°C. Планшет должен быть закрыт крышкой (пленкой) во время инкубации.

- Промойте стрипы разведенным Промывочным буфером трижды, добавляя каждый раз по 400 мкл буфера (смотри инструкцию, раздел 8, Ограничения).
- Добавьте 100 мкл Реагента G (голубой) в каждую лунку. Инкубируйте 20 минут при 18-25°C.
- Промойте стрипы разведенным Промывочным буфером трижды, добавляя каждый раз по 400 мкл буфера.
- Добавьте 100 мкл Реагента H (фиолетовый) в каждую лунку. Инкубируйте 10 минут при 18-25°C.
- Добавьте 100 мкл Реагента S (желтый) в каждую лунку.
- Встряхните и считайте оптическую плотность на длине волны 450 нм в течение 15 минут. Для более правильного встряхивания предпочтительно использовать автоматическое встряхивание.

Интерпретация результатов

Результаты необходимо интерпретировать с учетом результатов всех других анализов и с учетом клинического статуса пациента. В данном методе рекомендуется использовать 4-х параметрическую аппроксимацию для построения калибровочной кривой и расчета концентрации Hcy в неизвестных образцах.

Контроль качества

Рекомендуется каждой лаборатории использовать контрольные материалы гомоцистеина с известной концентрацией. Предлагается использовать контрольные образцы с низкой, средней и высокой концентрацией гомоцистеина. Контрольные образцы L-гомоцистеина человеческого происхождения имеют следующие концентрации:

Уровень контроля	Средняя концентрация гомоцистеина, мкмоль/л	Диапазон концентраций гомоцистеина, мкмоль/л
Низкий уровень	7.0	5.6 – 8.4
Средний уровень	12.5	10.0 – 15.0
Высокий уровень	25.0	20.0 – 30.0

Референсный интервал

Референсные значения должны определяться в каждой лаборатории с учетом особенностей тестируемой популяции. Полученные данные могут быть использованы в качестве референс-значений при условии достаточного для расчета количества образцов. Концентрация tHcy в плазме или сыворотке у здоровых лиц меняется в зависимости от возраста, пола, географических и генетических факторов. В научной литературе для взрослых мужчин и женщин предлагается использовать как референс-интервал величину 5 – 15 мкмоль/л. Также упоминается, что у мужчин концентрация tHcy выше, чем у женщин, и у женщин в постменопаузе концентрация tHcy выше по сравнению с пременопаузальным периодом. ^{18, 19} Уровень tHcy с возрастом повышается, и у пожилых лиц (>60 лет) ^{20, 21} нормальные значения находятся в интервале 5-20 мкмоль/л.

Образцы крови, взятые от 382 мужчин и женщин (100 скандинавов: 54 мужчин в возрасте 30-60 лет, 46 женщин в возрасте 29-70 лет; 185 испанцев, преимущественно мужчин в возрасте 20-65 лет, 97 американцев: 54 мужчин в возрасте 16-74 лет, 43 женщины в возрасте 15-79) были протестированы этим методом. Все обследуемые клинически были здоровы (т.е. не было информации о принимаемых препаратах, имеющихся заболеваниях и известном риске повышения Hcy). Средняя концентрация Hcy среди скандинавов была 8,4 мкмоль/л, среди испанцев/аризонцев - 8,9 мкмоль/л и среди американцев/жителей Кливленда - 9,3 мкмоль/л. Референс-значения гомоцистеина были установлены с доверительным интервалом 95% - 5-15 мкмоль/л для скандинавской популяции, 3,6-15,0 мкмоль/л для американской/кливлендской популяции и 2,9-16,0 мкмоль/л для испанской/аризонской популяции.

Исследуемый интервал

Калибраторы имеют концентрацию в диапазоне от 2,0 до 50,0 мкмоль/л.

Аналитические характеристики тест-системы

Воспроизводимость анализа

Воспроизводимость анализа была установлена в результате измерений 3-х уровней контролей в течение 20 дней в 4-х повторах для каждого уровня.

Данные представлены в следующей таблице:

Образцы	Средняя концентрация Hcy мкмоль/л	Воспроизводимость внутри серии	Общая воспроизводимость
Низкий контроль	6.1	8%	10%
Средний контроль	10.5	7%	9%
Высокий контроль	20.6	8%	10%

Предел обнаружения

Предел обнаружения (CV < 20 %) составляет 1.0 мкмоль/л.

Линейность

Если концентрация гомоцистеина превышает установленный диапазон калибровочной кривой, образец необходимо развести с реагентом А и проанализировать повторно.

Линейность была определена разбавлением 4 образцов различными количествами реагента А в качестве разбавителя.

Линейная регрессия анализа составила:

Тангенс угла наклона 0,98

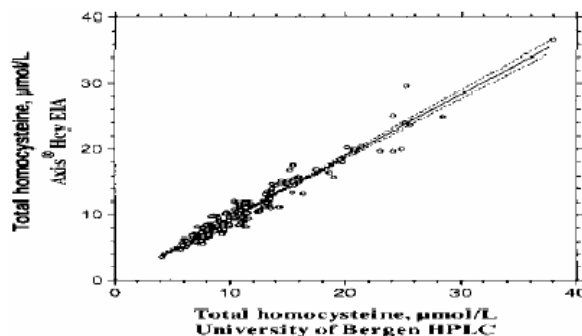
Интерсепт - 0.4 мкмоль/л

Кoeffициент корреляции (r^2) 0.99.

Сравнение с другим методом

Данный иммуноферментный метод ²² сравнивался с HPLC-методом Бергенского университета.

Сравнение образцов от 164 пациентов с концентрациями Hcy 3-37 мкмоль/л представлено в рисунке 1.



Вещества, мешающие определению гомоцистеина

Билирубин, гемоглобин, липиды, эритроциты, белки и фторид натрия добавлялись в образцы плазмы и тестировались для оценки интерференции. Результаты представлены в таблице:

Интерферирующее вещество	Концентрация интерферирующего вещества	% интерференции
Билирубин	0,5 г/л	-4,2
Гемоглобин	10,0 г/л	-4,6
Триглицериды	2 г/л	6,0
	10 г/л	1,5
Эритроциты	1,0 % объемн. %	-9,0
	5,0 % объемн. %	-4,9
Белок	80 г/л	1,8
Фторид натрия	10,0 г/л	-3,8



ОФИЦИАЛЬНЫЙ ДИСТРИБЬЮТОР

ООО «ДИАМЕБ»
ул. Чорновола, 97
г. Ивано-Франковск, 76005
тел.: +38 (0342) 775 122
факс: +38 (0342) 775 123
e-mail: info@diameb.ua
www.diameb.com