**НАБІР**

# ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО L-ГОМОЦИСТЕЇНУ У ЛЮДСЬКОЇ СИРОВАТЦІ АБО ПЛАЗМІ

## FHCY100, Homocysteine EIA

*Каталог. № : **FHCY100*** *Методика від **11-2011***
*Виробник : **Axis-Shield***
***(Великобританія)***

*Основою при проведенні аналізу є оригінал інструкції англійською мовою, вкладеної в набір. Номер і дата версії оригіналу та перекладу інструкції повинні співпадати.*

**Призначення**
Дана тест-система призначена для кількісного визначення загального L-гомоцистеїну в людській сироватці або плазмі. Завданням даного аналізу є діагностика та контроль лікування пацієнтів з передбачуваними гіпергомоцистеїнемією і гомоцистеїнурією.

**Опис методу**
*(Див оригінал інструкції).*

**Принцип методу**
Тест-система призначена для визначення гомоцистеїну в крові методом імуноферментного аналізу. Пов'язаний з білком Hcy відновлюється до вільного і перетворюється на S-аденозил-L-гомоцистеїн (SAH) ферментативним шляхом в спеціальній процедурі, що передує імуноаналізу. Фермент специфічний для L-форми гомоцистеїну, в якій останній і присутній у крові.

**Відновлення**
Суміш дисульфіду і білок-пов'язаної форми Hcy у зразку відновлюються до вільного гомоцистеїну при використанні дітіотреїтолу (DTT).
Білок-SS- Hcy DTT
*R1-SS- Hcy **Hcy,** де *R1 – будь-яка тиолова група
Hcy-SS- Hcy

**Ферментативна реакція**
Гомоцистеїн зразка перетворюється на S-аденозил-L-гомоцистеїн з використанням SAH-гідролази в присутності надлишку аденозину (Ad).
Hcy + Ad SAH + $H_2O$

**Імуноферментний аналіз**
Наступний твердофазовий імуноферментний аналіз заснований на конкуренції між SAH в зразку і SAH, іммобілізованим в лунках планшета, за сайти зв'язування з моноклональними анти-SAH антитілами. Після видалення анти-SAH антитіл, не пов'язаних з планшетом, додаються другі кролячі антимишачі антитіла, мічені пероксидазою хрону. Активність пероксидази вимірюється на спектрофотометрі після додавання субстрату.
Отримана абсорбція обернено пропорційна концентрації загального гомоцистеїну в пробі.

**Застереження**
1. Цей набір призначений тільки для діагностики *in vitro*.
2. Набір призначений тільки для визначення L-гомоцистеїну, але не D-гомоцистеїну.
3. Реагент F містить мишачі антитіла. Реагент G містить кролячі антитіла.
4. Реагент D містить 0.15% мертиолят (≤ 0.074% ртуті). Поводитись з обережністю.
5. Компоненти набору містять матеріали людського походження, які протестовані на відсутність антитіл до гепатиту B, C, ВІЛ-1 та ВІЛ-2. Проте жоден метод не може гарантувати, що продукти людського походження не інфіковані. Отже, з реагентами та зразками сироватки слід поводитись як з потенційно інфекційно небезпечними.
6. Деякі реагенти містять розчин азиду натрію (NaN) як консервант. Азид натрію може вступати в реакцію зі свинцем і міддю водопровідних труб з утворенням вибухових азидів металів. Змивати реагенти великою кількістю води для запобігання утворення азидів.
7. 0.01% мертиолят міститься в деяких реагентах як консервант. Кожен набір містить менше 0.028% ртуті. Поводитись з обережністю.
8. Не змішуйте реагенти з різних лотів.
9. Не використовуйте для роботи тест-систему з вичерпаним терміном придатності (вказаний на упаковці).

**Реагенти**
*Набір Гомоцистеїну FHCY100, 96 лунок*

| Компоненти набора | Розчин | Опис компонента | Об'єм |
|---|---|---|---|
| **Реагент A** | Робочий буфер | Фосфатний буфер, азид натрію | 54 мл |
| **Реагент B** | Аденозин/DTT | Аденозин/дитиотреітол, лимонна кислота | 3.5 мл |
| **Реагент C** | SAH-гідролаза | Рекомбінантна S-аденозил-L-гомоцистеїн гідролаза, трисбуфер, гліцерин, метилпарабен | 3.5 мл |
| **Реагент D** | Ферментний інгібітор | Метиолат, фосфатний буфер | 55 мл |
| **Реагент E** | Диаміназа аденозину | Диаміназа аденозину, фосфатний буфер, азид натрію, BSA, фенол – червоний барвник | 55 мл |
| **Реагент F** | a-SAH антитіло | Моноклональне мишаче анти-S-аденозил-L-гомоцистеїн антитіло, BSA, мертиолат | 25 мл |
| **Реагент G** | Ферментний кон'югат | Ферментний кон'югат кролячих анти-мишачих антитіл, пероксидаза хрону | 15 мл |
| **Реагент H** | Субстратний розчин | N-метил-2-пурролідон, пропіленгліколь | 15 мл |
| **Реагент S** | Стоп розчин | 0.8 M Сірчаної кислоти | 20 мл |
| **Промивний буфер** | Промивний буфер | Фосфатний буфер, мертиолат, Твін 20, BSA | 60 мл |
| **Калібратори 1-6** | Калібратори | Рекомбинантний S-аденозил-L-гомоцистеїн (2, 4, 8, 15, 30,50 мкмоль/л) в буфері з консервантом | 6x1.5 мл |
| **Микротитру-вальні полоски** | Мікротитрувальні полоски | Покриті рекомбінантним S-аденозил-L-гомоцистеїном | 12x8 лунок |

Промивний буфер - це концентрат. І тому його необхідно розвести (1 + 9) з очищеною водою перед використанням. Всі інші компоненти готові до використання.

*Набір контролів гомоцистеїну FHCY200*

| Компоненти набору | Опис компонента | Об'єм |
|---|---|---|
| **Низький контроль** | 7.0 мкмоль/л гомоцистеїну в розведених зразках сироватки людського походження, фосфатний буфер і консервант | 1.5 мл |
| **Середній контроль** | 12.5 мкмоль/л гомоцистеїну в розведених зразках сироватки людського походження, фосфатний буфер і консервант | 1.5 мл |
| **Високий контроль** | 25.0 мкмоль/л гомоцистеїну в розведених зразках сироватки людського походження, фосфатний буфер і консервант | 1.5 мл |

Всі контролі готові до використання.

*Промивний буфер для набору Гомоцистеїну FHCY050*

| Компоненти набору | Опис компонента | Об'єм |
|---|---|---|
| **Промивний буфер** | Фосфатний буфер, мертиолат, Твин 20, БСА | 1000 мл |

Промивний буфер - це концентрат. І тому його необхідно розвести (1 + 9) з очищеною водою перед використанням.

**Необхідні матеріали, що не входять до складу набору**
- Контроль гомоцистеїну (докладніше дивись розділ "Контроль якості")
- Пластикові або скляні пробірки для попередньої обробки зразків
- Піпетки на 25, 100, 200, 500 мкл і 8-канальна піпетка на 100-200 мкл
- Мірний посуд на 50 і 600 мл
- Інкубатор на 37 °C
- Вошер і рідер для планшетів

**Приготування і зберігання компонентів набору**
1. Всі реагенти тест-системи повинні зберігатися в холодильнику при 2-8 °C. Реагенти стабільні до закінчення терміну,

зазначеного на коробці, за умови зберігання та використання згідно з інструкцією. Відкриті реагенти стабільні протягом 12 тижнів при 2-8 °C і використання відповідно до інструкції.
2. Розчин для попередньої обробки зразків сироватки чи плазми (SPS) готується змішуванням реагентів A, B і C (дивись інструкцію, розділ 9). Розчин SPS стабільний протягом 1 години і готується заново для кожної серії аналізу.
3. Промивний буферний розчин розводиться 1:10 дистильованою водою перед використанням. Розведений розчин стабільний протягом 4-х тижнів при кімнатній температурі (18-25 °C).
4. Реагенти D і H (в темних флаконах) зберігати в темряві.
5. Необхідно, щоб смужки зберігалися в сухому місці (в пакеті є капсули з осушувачем) і прохолодному місці. Перед використанням пакет зі смужками витримати не менше 2-х годин при кімнатній температурі, не відкриваючи пакета.
6. Тільки необхідну для аналізу кількість смужок встановіть в рамку. Решту смужок поверніть в пакет з осушувачем і щільно закрийте.
7. Остерігайтеся залишати компоненти набору при температурі, що перевищує 37 °C - це може призвести до денатурації ферментів.

**Збір та підготовка зразків**
У даному аналізі можуть бути використані ЕДТА-плазма або сироватка.
Так як синтез гомоцистеїну відбувається в еритроцитах і після забору крові, дуже важливо підготувати зразки як описано нижче:

- Дати зразкам згорнутися протягом не більше 30 хвилин перед центрифугуванням і відділенням сироватки. Зразки сироватки зберігати охолодженими перед поділом.
- Зразки ЕДТА-плазми центрифугувати або охолодити відразу ж після забору. ЕДТА-плазма може зберігатися охолодженою до 6 годин перед центрифугуванням.

Прийом їжі може вплинути на рівні гомоцистеїну. Їжа, багата на протеїни, дає підвищені рівні гомоцистеїну і її прийому слід уникати.
Перед використанням зразки ретельно перемішати.

Зразки плазми або сироватки зберігати при 2-8 °C протягом 12 тижнів, до 3 тижнів при кімнатній температурі і до 8 місяців замороженими.

**Обмеження**

- Якщо використовується автоматичний вошер, необхідна дуже ретельна промивка після реагентів G (блакитного) - слабким розчином кислоти після води. Будь-який розчин, що залишився в ємкості, інтерферує з наступним кроком аналізу - додаванням реагентів H (субстратного розчину).
- Процедура промивання принципова для отримання точного результату. При ручній промивці промити потрібно 4 рази по 350 мкл замість 3 разів по 400 мкл. Після промивання висушити планшет на фільтрувальному папері.
- Не залишайте набір при температурі, що перевищує 37 °C - ферменти можуть денатурувати.
- У пацієнтів, які отримують ліки S-аденозил-метіонін, можуть бути хибно завищені результати концентрації гомоцистеїну.
- Зразки пацієнтів, які нещодавно отримували препарати з мишачих моноклональних антитіл в діагностичних або лікувальних цілях, можуть містити людські антимишачі антитіла (HAMA). HAMA, присутні в сироватці або плазмі, можуть перешкодити імуноаналізу, в якому використовуються мишачі моноклональні антитіла. Такі зразки не аналізуються в даному методі.
- Клінічні обмеження залежать від метаболічних впливів. Зразки від пацієнтів, які отримують препарати метотрексату, карбамазепіну, фенітоїну, оксиду азоту, антиконвульсанти і 6-азаурідін триацетату, можуть мати підвищений рівень гомоцистеїну в результаті метаболічної інтерференції цих препаратів з метаболізмом гомоцистеїну.

**Процедура аналізу**
Всі реагенти і планшет перед аналізом повинні бути доведені до кімнатної температури. Рекомендується аналізувати калібратори в дублях, і використовувати нову калібрувальну криву в кожній серії аналізу.

***Попередня обробка зразків***
1. Розчин для попередньої обробки зразків **(SPS)** готується за 1 годину до початку аналізу. Об'єм, необхідний для обробки 10 зразків (для іншої кількості зразків необхідно розрахувати об'єм SPS).

   Змішати зазначені реагенти:
   4.5 мл реагенту A
   0.25 мл Реагенту B
   0.25 мл Реагенту C

2. Розвести калібратори і зразки/контролі в пластикових або скляних пробірках наступним чином:
   25 мкл калібраторів/зразків/контролів + 500 мкл SPS
   Інкубувати 30 хвилин при 37 °C. Закрити пробірки на час інкубації кришечками або парафільмом.
   Перед кроком 3 даної процедури зразки повинні бути охолоджені.
3. Додати 500 мкл реагенту D. Потрясти пробірки для перемішування. Інкубувати 15 хвилин при 18-25 °C.
4. Додати 500 мкл реагенту E. Потрясти пробірки для перемішування
   Інкубувати 5 хвилин при 18-25 °C.
   ***Аналіз на планшеті***
5. Внесіть по 25 мкл розведених калібраторів/зразків/контролів після кроку 4 в лунки, покриті SAH-антитілами.
6. Додайте 200 мкл реагенту F в кожну лунку. Інкубуйте 30 хвилин при 18-25 °C. Планшет має бути закритий кришкою (плівкою) під час інкубації.
7. Промийте смужки розведеним промивним буфером тричі, додаючи щоразу по 400 мкл буфера (дивись інструкцію, розділ 8, Обмеження).
8. Додайте 100 мкл реагенту G (блакитний) в кожну лунку. Інкубуйте 20 хвилин при 18-25 °C.
9. Промийте смужки розведеним промивним буфером тричі, додаючи щоразу по 400 мкл буфера.
10. Додайте 100 мкл реагенту H (фіолетовий) в кожну лунку. Інкубуйте 10 хвилин при 18-25 °C.
11. Додайте 100 мкл реагенту S (жовтий) у кожну лунку.
12. Потрясти і порахувати оптичну щільність на довжині хвилі 450 нм протягом 15 хвилин. Для більш правильного струшування переважно використовувати автоматичне струшування.

**Інтерпретація результатів**
Результати необхідно інтерпретувати з урахуванням результатів усіх інших аналізів і з урахуванням клінічного статусу пацієнта.
У цьому методі рекомендується використовувати 4-х параметричну апроксимацію для побудови калібрувальної кривої та розрахунку концентрації Hcy в невідомих зразках.

**Контроль якості**
Рекомендується кожній лабораторії використовувати контрольні матеріали гомоцистеїну з відомою концентрацією. Пропонується використовувати контрольні зразки з низькою, середньою і високою концентрацією гомоцистеїну. Контрольні зразки L-гомоцистеїну людського походження мають такі концентрації:

| Рівень Контролю | Середня концентрація Гомоцистеїну, мкмоль/л | Діапазон концентрацій Гомоцистеїну, мкмоль/л |
|---|---|---|
| **Низький рівень** | 7.0 | 5.6 – 8.4 |
| **Середній рівень** | 12.5 | 10.0 – 15.0 |
| **Високий рівень** | 25.0 | 20.0 – 30.0 |

**Референсний інтервал**
Референсні значення мають визначатися в кожній лабораторії з урахуванням особливостей популяції, яка тестується. Отримані дані можуть бути використані як референсні значення за умови достатньої для розрахунку кількості зразків. Концентрація tHcy в плазмі або сироватці у здорових осіб змінюється в залежності від віку, статі, географічних і генетичних факторів. У науковій літературі для дорослих чоловіків і жінок пропонується використовувати як референс-інтервал величину 5-15 мкмоль/л. Також згадується, що у чоловіків концентрація tHcy вище, ніж у жінок, і у жінок в постменопаузі концентрація tHcy вище в порівнянні з пременопаузальним періодом. Рівень tHcy з віком підвищується, і у літніх осіб (> 60 років) нормальні значення знаходяться в інтервалі 5-20 мкмоль/л.
Зразки крові, взяті від 382 чоловіків і жінок (100 скандинавів: 54 чоловіка у віці 30-60 років, 46 жінок у віці 29-70 років; 185 іспанців, переважно чоловіків у віці 20-65 років, 97 американців: 54 чоловіків у віці 16-74 років, 43 жінки у віці 15-79) були протестовані цим методом. Всі обстежувані клінічно були здорові (тобто, не було інформації про прийняті препаратів, наявні захворювання і відомий ризик підвищення Hcy). Середня концентрація Hcy серед скандинавів була 8.4 мкмоль/л, серед іспанців/аризонців – 8.9 мкмоль/л і серед американців/жителів Клівленда – 9.3 мкмоль/л.
Референс-значення гомоцистеїну були встановлені з довірчим інтервалом 95% - 5-15 мкмоль/л для скандинавської популяції, 3.6-15.0 мкмоль/л для американської/Клівлендської популяції і 2.9-16.0 мкмоль/л для іспанської/аризонської популяції.

**Досліджуваний інтервал**
Калібратори мають концентрацію в діапазоні від 2.0 до 50.0 мкмоль/л.

**Аналітичні характеристики тест-системи**
***Відтворюваність аналізу***
Відтворюваність аналізу була встановлена в результаті вимірів 3-х рівнів контролів протягом 20 днів в 4-х повторах для кожного рівня.

Дані представлені в наступній таблиці:

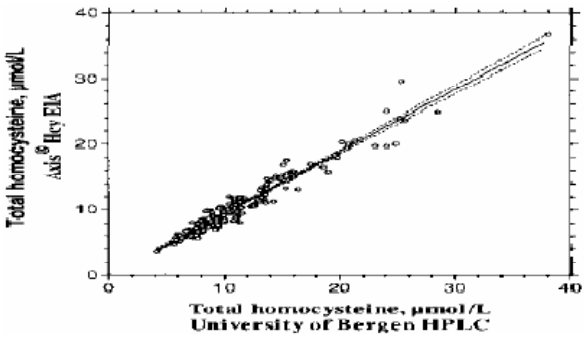
| Зразки | Середня концентрація Нсу, мкмоль/л | Відтворюваність всередині серії | Загальна відтворюваність |
|---|---|---|---|
| **Низький контроль** | 6.1 | 8% | 10% |
| **Середній контроль** | 10.5 | 7% | 9% |
| **Високий контроль** | 20.6 | 8% | 10% |

***Межа виявлення***
Межа виявлення (CV < 20%) складає 1.0 мкмоль/л.

***Лінійність***
Якщо концентрація гомоцистеїну перевищує встановлений діапазон калібрувальної кривої, зразок необхідно розвести з реагентом А і проаналізувати повторно.
Лінійність була визначена розведенням 4 зразків різними кількостями реагенту А в якості розчинника.

Лінійна регресія аналізу склала :
Тангенс кута нахилу 0.98
Інтерсепт - 0.4 мкмоль/л
Коефіцієнт кореляції ($r^2$) 0.99.

***Порівняння з іншим методом***
Даний імуноферментний метод порівнювався з HPLC-методом Бергенського університету.
Порівняння зразків від 164 пацієнтів з концентраціями Нсу 3-37 мкмоль/л представлено на малюнку 1.




***Речовини, які заважають визначенню гомоцистеїну***
Білірубін, гемоглобін, ліпіди, еритроцити, білки і фторид натрію додавалися в зразки плазми і тестувалися для оцінки інтерференції. Результати представлені в таблиці:

| Інтерферуюча речовина | Концентрація інтерферуючої речовини | % інтерференції |
|---|---|---|
| Білірубін | 0.5 г/л | - 4.2 |
| Гемоглобін | 10.0 г/л | - 4.6 |
| Тригліцериди | 2 г/л | 6.0 |
| | 10 г/л | 1.5 |
| Еритроцити | 1.0 % об'ємного % | - 9.0 |
| | 5.0 % об'ємного % | - 4.9 |
| Білок | 80 г/л | 1.8 |
| Фтори натрію | 10.0 г/л | - 3.8 |

***ОФІЦІЙНИЙ ДИСТРИБ'ЮТОР***

*ТОВ «ДІАМЕБ»*
*вул.Чорновола, 97*
*м. Івано-Франківськ, 76005*
*тел.: +38 (0342) 775 122*
*факс: +38 (0342) 775 123*
*e-mail: info@diameb.ua*
***www.diameb.com***

© Переклад на українську мову ТОВ «ДІАМЕБ»