

 IMMULITE[®]
2000

Homocysteine

DPC[®]

IMMULITE[®] 2000 Homocysteine

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE 2000 Analyzer — for the quantitative determination of L-homocysteine in human plasma or serum. This device can assist in the diagnosis and treatment of patients suspected of having hyperhomocysteinemia or homocystinuria.

Catalog Number: **L2KHO2** (200 tests)

Test Code: **HCY** Color: **Dark Gray**

Warning: Specimens from patients who are on drug therapy involving S-adenosyl-methionine may show falsely elevated levels of homocysteine.

Results on specimens obtained from patients taking methotrexate, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide, anti-convulsants, or 6-azauridine triacetate should be interpreted with caution as these substances interfere with homocysteine determination.

Summary and Explanation

Total homocysteine (tHcy) has emerged as an important risk factor in the assessment of cardiovascular disease.^{3-7,12} Hcy, a thiol-containing amino acid, is produced by the intracellular demethylation of methionine. Hcy thereby serves as a pool that can be later scavenged for use in the remanufacture of either methionine through the action of the folate-dependent enzyme methionine synthase or cysteine using the B6 dependent transsulphuration pathway.^{1,2} Hcy in plasma is found primarily in a protein bound form but free, oxidized and disulfide forms are also present.

Highly elevated levels of tHcy are found in patients with homocystinuria, a rare genetic disorder of the enzymes involved in Hcy metabolism.^{1,2,3} Homocystinuria patients exhibit arterial thromboembolism, mental retardation and early arteriosclerosis.¹ Less severe genetic

defects are also associated with moderate levels of Hcy.^{3,4,5}

Homocysteine has been identified as a indicator of cardiovascular disease. A meta-analysis of 27 epidemiological studies has suggested that a 5 µmol/L increase in tHcy could be associated with an odds ratio for coronary artery disease (CAD) of 1.6 for men and 1.8 for women, the same increase in risk as a 0.5 mmol/L increase in cholesterol.⁷ In addition, patients with chronic renal disease complicated by arteriosclerotic cardiovascular disease show elevated tHcy due to the inability of the kidney to remove Hcy from the blood.^{1,2,3}

Principle of the Procedure

Competitive Immunoassay.

The IMMULITE 2000 performs an on-line one-cycle sample pretreatment of patient plasma or serum with S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) hydrolase and dithiothreitol (DTT) solution in a reaction tube containing no bead. After a 30-minute incubation, the treated sample is transferred to a second reaction tube containing a SAH-coated polystyrene bead and an alkaline phosphatase-labeled antibody specific for SAH. During a 30-minute incubation, the converted SAH from the sample pretreatment competes with immobilized SAH for binding alkaline phosphatase-labeled anti-SAH antibody. Unbound enzyme conjugate is removed by centrifugal wash. Substrate is added and the procedure continues as described for typical immunoassays in the Operator's Manual.

Incubation Cycles: 2 × 30 minutes. 2 test positions per assay: 1 sample treatment cup; 1 immunoreaction cup.

Cycle 1: Release of bound homocysteine and conversion to SAH.

Cycle 2: Immunoreaction.

Specimen Collection

Heparinized and EDTA plasma are the samples of choice, but serum is also suitable for use. It is important to separate the plasma or serum from the cells as soon as possible after collection, as

synthesis of HCY will take place in red blood cells after sampling. **Samples should be stored on ice between the time of sampling and centrifugation.** Note that storage on ice makes the use of serum samples particularly difficult.

The use of an ultracentrifuge is recommended to clear lipemic samples.

Hemolyzed samples may indicate mistreatment of a specimen before receipt by the laboratory; hence the results should be interpreted with caution.

Centrifuging serum samples before a complete clot forms may result in the presence of fibrin. To prevent erroneous results due to the presence of fibrin, ensure that complete clot formation has taken place prior to centrifugation of samples. Some samples, particularly those from patients receiving anticoagulant therapy, may require increased clotting time.

Blood collection tubes from different manufacturers may yield differing values, depending on materials and additives, including gel or physical barriers, clot activators and/or anticoagulants. IMMULITE 2000 Homocysteine has not been tested with all possible variations of tube types. Consult the section on Alternate Sample Types for details on tubes that have been tested.

Volume Required: 15 μ L plasma or serum.

Storage: 14 days at 2–8°C, or 6 months at –20°C.

Warnings and Precautions

For *in vitro* diagnostic use.

Reagents: Store at 2–8°C. Dispose of in accordance with applicable laws.

Follow universal precautions, and handle all components as if capable of transmitting infectious agents. Source materials derived from human blood were tested and found nonreactive for syphilis; for antibodies to HIV 1 and 2; for hepatitis B surface antigen; and for antibodies to hepatitis C.

Sodium azide, at concentrations less than 0.1 g/dL, has been added as a preservative. On disposal, flush with large volumes of water to prevent the buildup of

potentially explosive metal azides in lead and copper plumbing.

Chemiluminescent Substrate: Avoid contamination and exposure to direct sunlight. (See insert.)

Water: Use distilled or deionized water.

Materials Supplied

Components are a matched set. Labels on the inside box are needed for the assay.

Homocysteine Bead Pack (L2HO12)

With barcode. 200 beads, coated with S-adenosyl-L-homocysteine (SAH). Stable at 2–8°C until the expiration date.

L2KHO2: 1 pack.

Homocysteine Reagent Wedge (L2HOA2)

With barcode. One wedge, containing 3 reagents: 15.5 mL bovine S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in buffer, with preservative. 4.5 mL dithiothreitol (DTT) in buffer. 11.5 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to murine monoclonal anti-SAH in buffer. Stable at 2–8°C until expiration date.

L2KHO2: 1 wedge.

Before use, tear off the top of the label at the perforations, without damaging the barcode. Remove the foil seal from the top of wedge; snap the sliding cover down into the ramps on the reagent lid.

Homocysteine Adjustors (LHOL, LHOH)

Two amber vials (Low and High), 2.0 mL each, of synthetically-derived S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) in a protein/buffer matrix. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

L2KHO2: 1 set.

Before making an adjustment, place the appropriate Aliquot Labels (supplied with the kit) on test tubes so that the barcodes can be read by the on-board reader.

Kit Components Supplied Separately

Homocysteine Sample Diluent (L2HOZ)

For the on-board dilution of high samples. 25 mL of concentrated (ready-to-use) homocysteine-free protein/buffer matrix.

Storage: 30 days (after opening) at 2–8°C or 6 months (aliquotted) at –20°C.

Barcode labels are provided for use with the diluent. Before use, place an appropriate label on a 16 × 100 mm test tube, so that the barcodes can be read by the on-board reader.

L2HOZ: 3 labels

L2SUBM: Chemiluminescent Substrate

L2PWSM: Probe Wash

L2KPM: Probe Cleaning Kit

LRXT: Reaction Tubes (disposable)

L2ZT: 250 Sample Diluent Test Tubes (16 × 100 mm)

L2ZC: 250 Sample Diluent Tube Caps

CCCM: A bi-level, nonhuman serum-based Cardiac Marker Control Module, containing homocysteine as one of four different constituents.

Also required

Distilled or deionized water; test tubes; controls.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the IMMULITE 2000 Operator's Manual.

See the IMMULITE 2000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

Recommended Adjustment Interval: 4 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or plasma or serum pools with at least two levels (low and high) of homocysteine.

Expected Values

Homocysteine levels can vary with age, gender, geographical area and genetic factors, therefore it is important for laboratories to establish their own reference ranges based on their local populations. Literature suggests a reference range of 5 – 15 µmol/L for adult males and females,¹¹ but also notes that men tend to have higher levels than women, and that postmenopausal women tend to have higher levels than premenopausal.¹²

One hundred and twenty samples from apparently healthy adult male and female volunteers age 22–66 were analyzed

using the IMMULITE 2000 Homocysteine procedure. The samples were drawn in heparinized plasma tubes and kept on ice prior to separation of the plasma from the cells. The median value was 7.7 µmol/L, with a central 95% range of

5.0 – 12 µmol/L.

Consider these limits as *guidelines* only. Each laboratory should establish its own reference ranges.

Limitations

Specimens from patients who are on drug therapy involving S-adenosyl-methionine may show falsely elevated levels of homocysteine.

Although analysis of the parent compounds of carbamazepine, phenytoin, 6-azauridine, and anthopterin indicate no cross-reactivity, specimens obtained from patients treated with these drugs, as well as with methotrexate, nitrous oxide, and other anticonvulsants, should be interpreted with caution as these substances have been shown to interfere in some homocysteine assays.

Heterophilic antibodies in human serum can react with the immunoglobulins included in the assay components causing interference with *in vitro* immunoassays. [See Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Samples from patients routinely exposed to animals or animal serum products can demonstrate this type of interference potentially causing an anomalous result. These reagents have been formulated to minimize the risk of interference; however, potential interactions between rare sera and test components can occur. For diagnostic purposes, the results obtained from this assay should always be used in combination with the clinical examination, patient medical history, and other findings.

Performance Data

See Tables and Graphs for data *representative* of the assay's performance. Results are expressed in µmol/L. (Unless otherwise noted, all were generated on heparinized plasma samples.)

Calibration Range: 2 to 50 µmol/L.

Analytical Sensitivity: 0.5 µmol/L

Precision: Samples were repeatedly assayed in quadruplicate over the course of several days, for a total of 20 runs and 80 replicates. (See "Precision" table.)

Linearity: Samples were assayed under various dilutions. (See "Linearity" table for representative data.)

Recovery: Samples spiked 1 to 19 with three homocysteine solutions (125, 250, 500 µmol/L), were assayed. (See "Recovery" table for representative data.)

Specificity: The antibody is highly specific for homocysteine. (See "Specificity" table.)

Bilirubin: Presence of conjugated and unconjugated bilirubin in concentrations up to 200 mg/L has no effect on results, within the precision of the assay.

Hemolysis: Presence of hemoglobin in concentrations up to 512 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Lipemia: Presence of triglycerides in concentrations up to 3,000 mg/dL has no effect on results, within the precision of the assay.

Alternate Sample Type: To determine whether serum can be used in the IMMULITE 2000 Homocysteine procedure, blood was collected on ice from 34 laboratory volunteers into heparinized, EDTA and plain vacutainer tubes. Samples were separated from the cells, and matched samples were spiked with homocysteine and then assayed by the IMMULITE 2000 Homocysteine procedure, with the following results.

(EDTA) = 0.98 (Heparin) + 0.85 µmol/L
r = 0.954

(Serum) = 1.02 (Heparin) – 0.53 µmol/L
r = 0.975

Means:

20.2 µmol/L (Heparin)
20.7 µmol/L (EDTA)
20.1 µmol/L (Serum)

To assess the effect of storage temperature, heparinized, EDTA and plain vacutainer tubes were collected from five volunteers for each tube type. Some tubes were stored at room temperature, while other tubes were kept on ice for various time periods *prior to separation*. The graphs below show the effect of storage

time and temperature for heparin, EDTA and serum. (See graphs 1-3).

Method Comparison 1: The assay was compared to a commercially available manual enzyme immunoassay (Kit A) on 168 plasma samples (Concentration range: approximately 4 to 43 µmol/L. See "Method Comparison 1" graph.) By linear regression:

(IML 2000) = 1.0 (Kit A) + 0.24 µmol/L
r = 0.966

Means:

12.9 µmol/L (IMMULITE 2000)
12.7 µmol/L (Kit A)

Method Comparison 2: The assay was also compared to an in-house HPLC method in use at a reference laboratory in the United States on 95 heparinized plasma samples (Concentration range: approximately 4 to 44 µmol/L. See "Method Comparison 2" graph.) By linear regression:

(IML 2000) = 0.97 (HPLC) + 0.71 µmol/L
r = 0.974

Means:

13.4 µmol/L (IMMULITE 2000)
13.2 µmol/L (HPLC)

Method Comparison 3: The assay was compared to another commercially available immunoassay (Kit B) on 113 plasma samples (Concentration range: approximately 4 to 23 µmol/L. See "Method Comparison 3" graph.) By linear regression:

(IML 2000) = 0.90 (Kit B) – 0.02 µmol/L
r = 0.925

Means:

8.7 µmol/L (IMMULITE 2000)
9.6 µmol/L (Kit B)

References

- 1) Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: interruption of the coordinate regulation by s-adenosylmethionine of the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992;55:131-8. 2) Jacques PF, Bostom AG, Williams RR, et al. Relation between folate status, a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase and plasma homocysteine concentrations. *Circulation* 1996;93:7-9. 3) Malinow MR. Plasma homocysteine and arterial occlusive diseases: A mini review. *Clin Chem*. 1995;40:173-76. 4) Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, et al. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *New Eng J Med* 1991;324:1149-55. 5) Deloughery TG, Evans A,

Sadeghi A, et al. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase: Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation* 1996;94:3074-78. 6) Bostom AG, Selhub J. Homocysteine and arteriosclerosis: Subclinical and clinical disease associations. *Circulation* 1999;99:2361-63. 7) Boushey CJ, Beresford SAA, et al. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. *JAMA* 1995;274(13):1049-57. 8) Guttormsen AB, Svarstad E, et al. Elimination of homocysteine in subjects with end-stage renal failure. *Irish J Med Sci* 1995;164:8. 9) Bostom AG, Lathrop, L. Hyper-homocysteinemia in end-stage renal disease (ESDR): Prevalence, etiology and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997;52:10-20. 10) Refsum H, Ueland PM. Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism. *TIPS* 1990;11:411-16. 11) Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-79. 12) Nehler MR, Taylor LM, Porter JM. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: A Review. *Cardiovasc Pathol* 1997;6:1-9.

Technical Assistance

In the United States, contact DPC's Technical Services department.
Tel: 800.372.1782 or 973.927.2828
Fax: 973.927.4101. Outside the United States, contact your National Distributor.

The Quality System of Diagnostic Products Corporation is registered to ISO 13485:2003.

Tables and Graphs

Precision (µmol/L)

	Mean ³	Within-Run ¹		Total ²	
		SD ⁴	CV ⁵	SD	CV
1	3.94	0.29	7.4%	0.41	10.4%
2	9.88	0.47	4.8%	0.75	7.6%
3	11.1	0.38	3.4%	0.46	4.1%
4	25.9	1.06	4.1%	1.31	5.1%

Specificity (µmol/L)

Compound ¹	Amount Added ² µmol/L	% Cross reactivity ³
Adenosine	5000	ND
S-adenosyl-L-methionine	500	0.6%
Cystathionine	500	6.1%
L-Cysteine	100000	ND
Gluthathione	100000	ND

ND: Not detectable.⁴

Linearity (µmol/L)

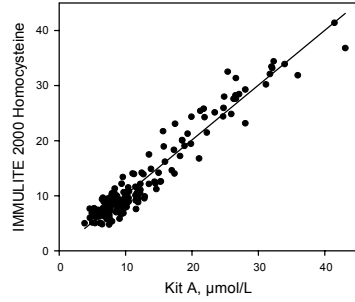
	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8 ⁵	19.2	—	—
	4 in 8	9.47	9.60	99%
	2 in 8	4.94	4.80	103%
	1 in 8	2.11	2.40	88%
2	8 in 8	25.2	—	—
	4 in 8	13.8	12.6	110%
	2 in 8	6.15	6.30	98%
	1 in 8	3.34	3.15	106%
3	8 in 8	31.6	—	—
	4 in 8	15.7	15.8	99%
	2 in 8	7.44	7.90	94%
	1 in 8	3.37	3.95	85%
4	8 in 8	47.5	—	—
	4 in 8	24.2	23.7	102%
	2 in 8	11.5	11.9	97%
	1 in 8	4.91	5.94	83%

Recovery (µmol/L)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	7.41	—	—
	A	13.3	13.3	100%
	B	20.2	19.5	104%
	C	34.4	32.0	108%
2	—	9.96	—	—
	A	14.7	15.7	94%
	B	22.6	22.0	103%
	C	36.2	34.5	105%
3	—	13.3	—	—
	A	16.9	18.9	89%
	B	26.0	25.1	104%
	C	32.0	37.6	85%

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
4	—	20.2	—	—
	A	27.7	25.4	109%
	B	33.0	31.7	104%
	C	44.5	44.2	101%

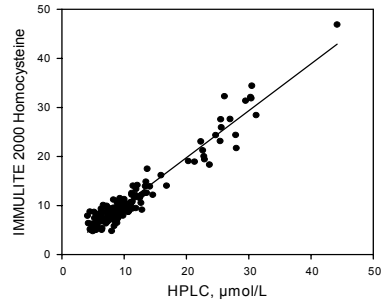
Method Comparison 1



$$(IML\ 2000) = 1.0\ (Kit\ A) + 0.024\ \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.966$$

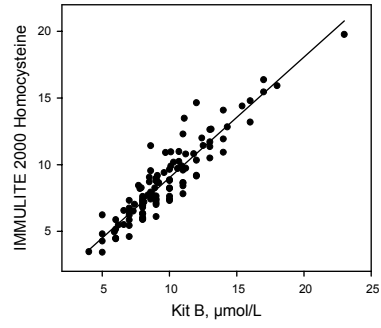
Method Comparison 2



$$(IML\ 2000) = 0.97\ (HPLC) + 0.71\ \mu\text{mol/L}$$

$$r = 0.974$$

Method Comparison 3

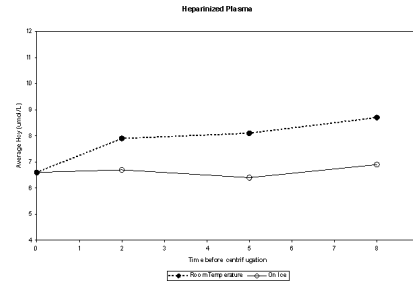


$$(IML\ 2000) = 0.90\ (Kit\ B) - 0.02\ \mu\text{mol/L}$$

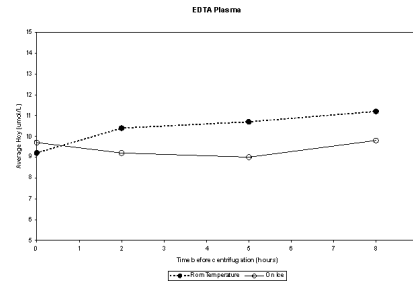
$$r = 0.925$$

Effect of Storage Temperature on Different Sample Types

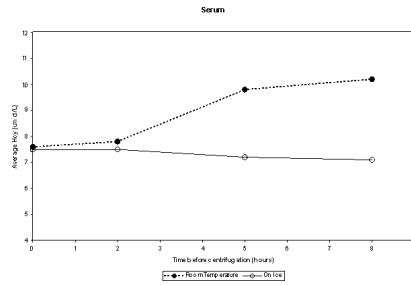
Graph 1: Heparin



Graph 2: EDTA



Graph 3: Serum



Deutsch. Precision: ¹Intra-Assay, ²Gesamt, ³Mittelwert, ⁴S (Standardabweichung), ⁵CV (Variationskoeffizient). Linearity: ¹Verdünnung, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. Recovery: ¹Probe, ²Beobachtet (B), ³Erwartet (E), ⁴% B/E. Specificity: ¹Verbindung, ²zugesezte Menge, ³% Kreuzreaktivität, ⁴NN: Nicht nachweisbar. Method Comparison: Homocysteine: Homocystein.

Español. Precision: ¹Intraensayo, ²Total, ³Media, ⁴DS, ⁵CV. Linearity: ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E, ⁵8 en 8. Recovery: ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E. Specificity: ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³% Reacción cruzada, ⁴ND: no detectable. Method Comparison: Homocysteine: Homocisteína.

Français. Precision: ¹Intraessai, ²Total, ³Moyenne, ⁴SD, ⁵CV. Linearity: ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴% O/A, ⁵8 dans 8. Recovery: ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴% O/A. Specificity: ¹Composé, ²ajouté, ³Réaction croisée %, ⁴ND: non détectable. Method Comparison: Homocysteine: Homocystéine.

Italiano. Precision: ¹Intra-serie, ²Totale, ³Media, ⁴SD (Deviazione Standard), ⁵CV (Coefficiente di Variazione). Linearity: ¹Diluizione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴% O/A, ⁵8 in 8. Recovery: ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴% O/A. Specificity: ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Percentuale di Crossreattività, ⁴ND: non determinabile. Method Comparison: Homocysteine: Omocisteina.

Português. Precision: ¹Entre-ensaios, ²Total, ³Média, ⁴Desvio padrão, ⁵Coefficiente de variação. Linearity: ¹Diluição, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E, ⁵8 em 8. Recovery: ¹Solução, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴% O/E. Specificity: ¹Composto, ²Quantidade adicionada, ³Percentagem de reacção cruzada, ⁴ND: não detectável. Method Comparison: Homocysteine: Homocysteine.

Deutsch

Homocystein

Anwendung: Zur in vitro-Diagnostik unter Verwendung des IMMULITE 2000 Systems - zur quantitativen Bestimmung von L-Homocystein im Plasma oder Serum humanen. Diese Bestimmungen können in der Diagnose und Therapie von Patienten mit Homocysteinurie oder Hypercysteinämie hilfreich sein.

Artikelnummern: **L2KHO2** (200 Tests)

Testcode: **HCY** Farbe: **dunkelgrau**

Warnung: Bei einer Behandlung mit S-Adenosyl-Methionin enthaltenden Therapeutika können falsch-erhöhte Homocystein-Spiegel gemessen werden.

Ergebnisse von Patienten, die mit Methotrexat, Carbamazepin, Phenytoin, NOx, krampflösenden Medikamenten oder 6-Azauridin Triacetate therapiert wurden, sollten vorsichtig interpretiert werden, da die Substanzen bei der Homocystein-Bestimmung interferieren.

Klinische Relevanz

Das Homocystein (tHcy) hat sich als ein wichtiger Risikofaktor zur Beurteilung kardiovaskulärer Erkrankungen herausgestellt.^{3-7,12} Homocystein, eine schwefelhaltige Aminosäure entsteht bei der Demethylierung des Methionins. Es kann bei Bedarf wiederum zur Methioninbildung durch die Folsäure abhängige Methionin-Synthase verwendet werden oder zur Cystein-Synthese über den B-6 abhängigen sogenannten Transsulfurationsweg.^{1,2} Im Plasma kommt Homocystein hauptsächlich proteingebunden vor, es liegen aber auch freie, oxidierte und Disulfid-Formen vor.

Stark erhöhte Homocystein-Spiegel werden bei Patienten mit Homocysteinurie gefunden.^{1,2,3} Hierbei handelt es sich um einen seltenen genetischen Defekt der Enzyme des Homocystein-Stoffwechsels. Patienten mit Homocysteinurie zeigen Thrombosen, Entwicklungsstörungen und eine frühe Arteriosklerose.¹ Weniger schwere genetische Defekte sind mit geringfügig erhöhten Homocystein-Spiegeln verbunden.^{3,4,5}

Es hat sich herausgestellt, dass Homocystein ein Indikator kardiovaskulärer Erkrankungen ist. Eine Metaanalyse 27 epidemiologischer Studien zeigte, dass eine Erhöhung der Homocystein-Konzentration um 5 µmol/l das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Männern 1,6-fach und bei Frauen 1,8-fach erhöht. Dieselbe Erhöhung des Risikos wird bei einer Erhöhung der Cholesterinkonzentration um 0,5 mmol/l beobachtet.⁷ Ebenso werden bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung und kardiovaskulärer Erkrankungen erhöhte Homocystein-Spiegel gefunden. Ursache dafür ist der krankheitsbedingte Funktionsverlust der Niere, die das Homocystein nicht mehr aus dem Blut herausfiltern kann.^{1,2,3}

Methodik

Kompetitiver Immunoassay.

Zuerst wird mit dem IMMULITE 2000 eine automatische Ein-Schritt Vorbehandlung der Patienten Plasma- oder Serumprobe durchgeführt. Die Probe wird in einem Röhrchen ohne Kugel mit DTT und der S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) Hydrolase inkubiert. Nach dieser 30 minütigen Inkubation wird die so behandelte Probe in ein zweites Röhrchen überführt. Dieses Röhrchen enthält die mit SAH beschichtete Kugel und einen mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper gegen SAH. Während der nun folgenden 30 minütigen Inkubation konkurriert das im Vorbehandlungsschritt gebildete SAH in der Probe mit dem immobilisierten SAH an der Kugel um die Bindungsstellen des mit alkalischer Phosphatase markierten Anti-SAH-Antikörpers. Überschüssiges Enzymkonjugat wird im folgenden Waschschrift entfernt. Im nächsten Schritt wird Substrat zugegeben. Die weiteren Schritte erfolgen wie im Handbuch dargestellt.

Inkubations-Schritte: 2 × 30 Minuten. 2 Positionen in der Inkubationskette: 1 Röhrchen zur Probenvorbehandlung; 1 Röhrchen für die Immunreaktion.

Schritt 1: Freisetzung des gebundenen Homocysteins und Umwandlung zum SAH.

Schritt 2: Immunreaktion.

Probengewinnung

Die Verwendung von Heparin- bzw. EDTA-Plasma wird empfohlen. Die Verwendung von Serumproben ist ebenfalls möglich. Das Plasma / Serum muss möglichst schnell von den Blutzellen getrennt werden, da von den Erythrozyten Homocystein synthetisiert wird. **Aus diesem Grund sollten die Blutproben bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert werden.** Diese notwendige Lagerung auf Eis macht die Verwendung von Serumproben schwierig.

Der Einsatz einer Ultrazentrifuge wird zur Klärung von lipämischen Proben empfohlen.

Bei hämolysierten Proben besteht die Möglichkeit einer unsachgemäßen Handhabung vor Eintreffen im Labor, daher sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren.

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinnseln führen. Um fehlerhaften Analysenergebnissen infolge von Gerinnseln vorzubeugen, ist sicherzustellen, dass die Gerinnung vor der Zentrifugation der Proben vollständig abgeschlossen ist. Insbesondere Proben von Patienten unter Antikoagulantientherapie können eine verlängerte Gerinnungszeit aufweisen.

Blutentnahmeröhrchen von verschiedenen Herstellern können differierende Werte verursachen. Dies hängt von den verwendeten Materialien und Additiven (Gel oder physische Trennbarrieren, Gerinnungsaktivatoren und /oder Antikoagulantien) ab. IMMULITE 2000 Homocystein sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge: 15 µl Plasma oder Serum.

Lagerung: 14 Tage bei 2–8°C oder 6 Monate bei –20°C.

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Bei einer Temperatur von 2–8°C lagern. Gemäß der anwendbaren Vorschriften verwerfen.

Die allgemein gültigen Vorsichtsmaßnahmen sind zu beachten und alle Komponenten als potentiell infektiöses Material zu behandeln. In diesem Testbesteck enthaltenen Reagenzien humanen Ursprungs erwiesen sich bei der Prüfung auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper als negativ.

Bestimmten Komponenten wurde Natriumazid (<0,1 g/dl) hinzugefügt. Um die Bildung von explosiven Metallaziden in Blei- und Kupferrohren zu verhindern, sollten die Reagenzien nur zusammen mit großen Wassermengen in die Kanalisation gespült werden.

Chemilumineszenz-Substratmodul:

Kontaminationen sowie direkte Sonnenlichteinwirkungen müssen vermieden werden. (Siehe Packungsbeilage.)

Wasser: Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser benutzen.

Im Lieferumfang enthalten

Die Bestandteile der Testpackung sind aufeinander abgestimmt. Die Barcode-Aufkleber auf der Innenverpackung werden zur Testdurchführung gebraucht.

Homocystein Kugel-Container (L2HO12)

Der barcodierte Kugel-Container enthält 200 Polystyrol-Kugeln beschichtet mit S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH). Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar.
L2KHO2: 1 Container.

Homocystein Reagenzbehälter (L2HOA2)

Der barcodierte Reagenz-Container enthält 3 Reagenzien: 15,5 ml S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase (Rind) in Puffer (mit Konservierungsmittel), 4,5 ml Dithiothreitol (DTT) in Puffer und 11,5 ml alkalische Phosphatase konjugiert mit monoklonalen Anti-SAH Antikörpern (Maus) in Puffer. Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar.
L2KHO2: 1 Behälter.

Vor Gebrauch den Aufkleber an der Perforation abreißen, ohne dabei die Barcodierung zu beschädigen. Die Folie von der Oberseite des Containers entfernen. Den Schiebedeckel nach unten in die Führung des Reagenziendeckels einrasten lassen.

Homocystein Kalibratoren (LHOL, LHOH)

Zwei braune Fläschchen (niedrig und hoch), mit je 2,0 ml synthetisch hergestelltem S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) in Protein/Puffer-Matrix. 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar oder 6 Monate bei –20°C (aliquotiert).
L2KHO2: 1 Set

Vor der Kalibrierung die entsprechenden Aufkleber (dem Kit beiliegend) auf Röhrchen kleben, so daß die Barcodes vom Barcodereader des Systems gelesen werden können.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

Homocystein-Verdünnungspuffer (L2HOZ)

Zur automatischen Verdünnung von Proben hoher Konzentration. Es enthält 25 ml Konzentrat (gebrauchsfertig) Homocystein-freie Protein-Puffermatrix. Lagerung: 30 Tage (nach Öffnen) bei 2–8°C oder 6 Monate bei –20°C (aliquotiert).

Zum Einsatz des Verdünnungsreagenz (Diluents) werden Barcode Etiketten mitgeliefert. Vor Verwendung ein entsprechendes Etikett so auf ein 16×100 mm Teströhrchen kleben, dass es vom eingebauten Barcode Reader gelesen werden kann.

L2HOZ: 3 Etiketten

L2SUBM: Chemilumineszenz-Substratmodul

L2PWSM: Waschmodul

L2KPM: Reinigungsmodul

LRXT: (Einmal-) Reaktionsgefäße

L2ZT: 250 Teströhrchen (16 × 100 mm) für die Probenverdünnung

L2ZC: 250 Röhrchenverschlüsse für die Probenverdünnung

CCCM: DPC Kardiomarker-Kontrolle (4 Analyte, 2 Konzentrationen), kann über die DPC Biermann GmbH bezogen werden.

Ebenfalls benötigt
Destilliertes bzw. deionisiertes Wasser;
Teströhrchen, Kontrollen.

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist unbedingt zu beachten, dass die Wartungen, wie im IMMULITE 2000-Handbuch beschrieben, regelmäßig durchgeführt werden.

Hinweise zur Vorbereitung, täglichen Inbetriebnahme des Systems, der Kalibrierung sowie Verfahren zur Test- und Qualitätskontrolle entnehmen Sie bitte dem IMMULITE 2000-Handbuch.

Empfohlenes Kalibrationsintervall:
4 Wochen.

Qualitätskontrollseren:

Kontrollen oder Seren mit Homocystein in zumindest zwei Konzentrationen (niedrige und hohe) verwenden.

Referenzwerte

Da Referenzbereiche von der Auswahl des Probandenkollektivs und von regionalen Gegebenheiten abhängig sind, sollte jedes Labor eigene Referenzbereiche ermitteln. In der Literatur wird ein Referenzbereich von 5-15 $\mu\text{mol/l}$ für erwachsene Männer und Frauen beschrieben. Es muss berücksichtigt werden,¹¹ dass bei Männern tendenziell höhere Werte gefunden werden als bei Frauen. Hinzu kommt, dass postmenopausale Frauen höhere Werte zeigen als prämenopausale Frauen.¹²

In einer Studie des Herstellers wurde Homocystein in 120 Proben von anscheinend gesunden Probanden (Alter 22-66 Jahre) mit dem IMMULITE 2000 bestimmt. Die Probenabnahme erfolgte in Heparin-Röhrchen, die bis zur Trennung der Zellen vom Plasma auf Eis gelagert wurden. Es wurde ein Median von 7,7 $\mu\text{mol/l}$ und ein 95% Vertrauensbereich von **5,0 – 12 $\mu\text{mol/l}$** ermittelt.

Diese Grenzwerte sind lediglich als Richtlinien aufzufassen. Jedes Labor sollte seine eigenen Referenzbereiche etablieren.

Grenzen der Methode

Bei einer Behandlung mit S-Adenosyl-Methionin enthaltenden Therapeutika können falsch-erhöhte Homocystein-Spiegel gemessen werden.

Obwohl die Substanzen Carbamazepin, Phenytoin, 6-Azauridin und Anthopterin keine Kreuzreaktivität zeigen, sollten Proben von Patienten, die mit diesen Medikamenten behandelt werden, sowie von Patienten, die mit Methotrexat, Stickstoffoxiden oder anderen Antikonvulsiva behandelt werden mit Vorsicht interpretiert werden, da diese Substanzen in einigen Homocystein-Assays interferieren können.

Heterophile Antikörper in Humansenen können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzerscheinungen innerhalb des in vitro Immunoassays verursachen. (Clin. Chem. 1988;34:27-33) Proben von Patienten, die häufig mit Tier- bzw. Tierserumprodukten zu tun haben, können die erwähnten Interferenzen verursachen und zu anomalen Resultaten führen. Die verwendeten Reagenzien sind so konzipiert, dass das Risiko einer Interferenz mit den zu messenden Proben minimiert ist. Dennoch können potentiell Interaktionen zwischen seltenen Seren und den Testkomponenten auftreten. Zu diagnostischen Zwecken sollten die mit dem Assay erhaltenen Ergebnisse immer in Kombination mit der klinischen Untersuchung, der Patientenanamnese und anderen Befunden gesehen werden.

Leistungsdaten

Repräsentative Daten zum Test entnehmen Sie bitte den Tabellen und graphischen Darstellungen im englischen Teil dieser Anleitung. Die Ergebnisse sind in $\mu\text{mol/l}$ angegeben. (Wenn nicht anders dargestellt, wurden alle Untersuchungen mit Heparin-Proben durchgeführt).

Messbereich: 2–50 $\mu\text{mol/l}$

Analytische Sensitivität: 0,5 $\mu\text{mol/l}$

Präzision: Verschiedene Proben wurden in Vierfachbestimmung über mehrere Tage bestimmt in einer Gesamtzahl von 20 Läufen mit 80 Bestimmungen. (Siehe "Precision" Tabelle.)

Linearität: Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen getestet.

(Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Linearity“.)

Wiederfindung: Proben wurden mit drei Lösungen (125, 250 und 500 µmol/l) im Verhältnis von 1:19 versetzt. (Siehe Tabelle "Recovery" für repräsentative Daten.)

Spezifität: Der Assay ist hochspezifisch für Homocystein. (Siehe Tabelle "Specificity".)

Bilirubin: Konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Messung, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Hämolyse: Hämoglobin hat in Konzentrationen bis zu 512 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Lipämie: Triglyceride haben in Konzentrationen bis zu 3 000 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Verschiedene Probenmaterialien: Die Untersuchungen zum Einsatz verschiedener Probenmaterialien wurde folgendermaßen durchgeführt: Von 34 Probanden wurde Blut in Heparin, EDTA und Serumröhrchen entnommen. Die Proben wurden zentrifugiert, mit Homocystein gespikt und mit dem IMMULITE 2000 Homocystein analysiert. Folgende Ergebnisse wurden gefunden:

(EDTA) = 0,98 (Heparin) + 0,85 µmol/l
r = 0,954

(Serum) = 1,02 (Heparin) – 0,53 µmol/l
r = 0,975

Mittelwerte:
20,2 µmol/l (Heparin)
20,7 µmol/l (EDTA)
20,1 µmol/l (Serum)

Um den Einfluss der Temperatur auf die Homocystein-Konzentration bei der Probenlagerung zu untersuchen, wurde Heparin-, EDTA-Plasma sowie Serum von 5 Probanden entnommen. Vor der Zentrifugation wurden Röhrchen bei Raumtemperatur oder auf Eis gelagert. Die graphische Darstellung zeigt die zeitabhängige Veränderung der Homocystein-Konzentration durch die Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen. (Siehe Graph 1-3)

Methodenvergleich 1: Der Assay wurde mit einem kommerziell erhältlichen manuellen Enzymimmunoassay (Kit A) auf der Basis von 168 Plasmaproben (Konzentrationsbereich: 4–43 µmol/l) verglichen. Siehe graphische „Method Comparison 1.“) Berechnung der linearen Regression:

(IML 2000) = 1,0 (Kit A) + 0,24 µmol/l
r = 0,966

Mittelwerte:
12,9 µmol/l (IMMULITE 2000)
12,7 µmol/l (Kit A)

Methodenvergleich 2: Der Assay wurde mit einer in-house HPLC-Methode in einem Referenzlabor in den USA auf der Basis von 95 Heparin-Plasma Proben (Konzentrationsbereich: 4–44 µmol/l) verglichen. Siehe graphische „Method Comparison 2.“) Berechnung der linearen Regression:

(IML 2000) = 0,97 (HPLC) + 0,71 µmol/l
r = 0,974

Mittelwerte:
13,4 µmol/l (IMMULITE 2000)
13,2 µmol/l (HPLC)

Methodenvergleich 3: Der Assay wurde mit einem weiteren kommerziell erhältlichen Immunoassay (Kit B) auf der Basis von 113 Plasmaproben (Konzentrationsbereich: 4–23 µmol/l) verglichen. Siehe graphische „Method Comparison 3.“) Berechnung der linearen Regression:

(IML 2000) = 0,90 (Kit B) – 0,02 µmol/l
r = 0,925

Mittelwerte:
8,7 µmol/l (IMMULITE 2000)
9,6 µmol/l (Kit B)

Anwendungsberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

Das Qualitätssystem der Diagnostic Products Corporation ist nach ISO 13485:2003 registriert.

Español

Homocisteína

Utilidad del Test: Para el diagnóstico *in vitro* usado con el Analizador IMMULITE 2000, para la medición cuantitativa de L-homocisteína en suero humano o

plasma. Este kit no está pensado para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes que tengan hiperhomocistinemia u homocistinuria.

Números de Catálogo:
L2KHO2 (200 tests)

Código del Test: **HCY** Color: **Gris oscuro**

Aviso: Las muestras de pacientes bajo terapia con S-adenosil-metionina pueden generar niveles falsamente elevados de homocisteína.

Los resultados de las muestras de pacientes en tratamiento con methotrexato, carbamacepina, fenitoina, óxido nitroso, anticonvulsivos o triacetato 6-azauridina deben interpretarse con precaución ya que estas sustancias interfieren con la determinación de la homocisteína.

Resumen y Explicación del Test

La Homocisteína total (tHcy) ha salido a la luz como un importante factor predictivo para evaluar la enfermedad cardiovascular.^{3-7,12} Hcy, es un aminoácido que contiene un grupo tiol, producto de la demetilación intracelular de metionina. Por ello, Hcy sirve como pool que puede ser usado mas tarde para regenerar metionina mediante la acción de la enzima metionina sintetasa folato dependiente o cisteína usando la vía de transulfuración B6 dependiente.^{1,2} Hcy se encuentra en plasma principalmente unido a proteínas, pero también están presentes formas libres, oxidadas y disulfuro.

Altos niveles de tHcy son encontradas en pacientes con homocistinuria, un raro desorden genético de enzimas involucradas en el metabolismo de Hcy.^{1,2,3} Pacientes con homocistinuria presentan tromboembolismo arterial, retraso mental y arteriosclerosis.¹ Defectos genéticos menos severos también están asociados con moderadamente elevados niveles de Hcy.^{3,4,5}

La homocisteína ha sido identificada como marcador de enfermedad cardiovascular. Un meta análisis 27 estudios epidemiológicos sugiere que un incremento de 5 µmol/l en tHcy podría ser

asociado con un incremento del ratio de probabilidad de enfermedad arterial o coronaria (CAD) de 1,6 para hombres y 1,8 para mujeres, el mismo incremento de riesgo que un aumento de 0,5 mmol/l de colesterol.⁷ Además, pacientes con enfermedad renal crónica complicada con arteriosclerosis cardiovascular presentan elevada tHcy debido a la incapacidad del riñón para eliminar la Hcy de la sangre.^{1,2,3}

Principio del Test

Inmunoensayo competitivo.

IMMULITE 2000 realiza un ciclo de pretratamiento de la muestra de plasma o suero del paciente con S-adenosil-L-homocisteína (SAH) hidrolasa y solución de ditiotriol (DTT) en un tubo de reacción sin bola. Después de una incubación de 30 minutos, la muestra tratada es transferida a un segundo tubo de reacción con una bola de poliestireno recubierta de SAH y fosfatasa alcalina unida a un anticuerpo específico para SAH. Durante 30 minutos de incubación, la SAH transformada de la muestra pretratada compite con la SAH inmobilizada por la unión al anticuerpo anti-SAH unido a fosfatasa alcalina. El conjugado enzimático no unido es eliminado mediante un lavado por centrifugación. El substrato es añadido y el proceso continúa como el resto de los inmunoensayos, tal y como se describe en el manual del operador.

Ciclos de incubación: 2 × 30 minutos. 2 posiciones de test por ensayo: una cubeta de muestra para el pretratamiento; una cubeta para la inmunoreacción.

Primer Ciclo: Liberación de la homocisteína unida y conversión a SAH.

Segundo Ciclo: Inmunoreacción.

Recogida de la muestra

Plasma heparinizado y EDTA son las muestras de elección, pero el suero también puede ser utilizado. Es importante separar el plasma o suero de las células lo antes posible después de la recogida de la muestra, debido a que la síntesis de HCY puede tener lugar en los eritrocitos después de la toma de muestra.

Las muestras deberían ser conservadas en hielo entre la toma de muestra y su centrifugación. La conservación en hielo hace

particularmente difícil el uso de muestras de suero.

Se recomienda el uso de una ultracentrífuga para aclarar las muestras lipémicas.

Las muestras hemolizadas podrían indicar una mala manipulación de la muestra antes de ser recibida por el laboratorio; en este caso, los resultados deben interpretarse con precaución.

La centrifugación de las muestras de suero antes de que se forme el coágulo puede ocasionar la presencia de fibrina. Para evitar resultados erróneos debidos a la presencia de fibrina, asegurarse que se ha formado el coágulo completamente antes de centrifugar las muestras. Algunas muestras, particularmente aquellas de pacientes sometidos a terapia anticoagulante, pueden requerir mayor tiempo de coagulación.

Los tubos para recoger sangre de distintos fabricantes pueden producir valores diferentes, dependiendo del material del tubo y de los aditivos, incluyendo barreras de gel o barreras físicas, activadores de la coagulación y/o anticoagulantes. El Homocisteína IMMULITE 2000 no ha sido analizado con todos los distintos tipos de tubos. Para obtener detalles sobre los tipos de tubos que se han analizado, consulte la sección de Tipos de Muestras Alternativos.

Volumen requerido: 15 µl plasma o suero.

Conservación: 14 días a 2–8°C, o 6 meses a –20°C.

Advertencias y Precauciones

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Reactivos: Mantener a 2–8°C. Desechar de acuerdo con las normas aplicables.

Siga las precauciones universales y manipule todos los componentes como si fueran capaces de transmitir agentes infecciosos. Los materiales derivados de sangre humana han sido analizados y son negativos para sífilis; para anticuerpos frente al HIV 1 y 2; para el antígeno de superficie de hepatitis B y para los anticuerpos de hepatitis C.

Se ha usado Azida sodica, en concentraciones menores de 0,1 g/dl, como conservante. Para su eliminación,

lavar con grandes cantidades de agua para evitar la aparición de residuos de azidas metálicas, potencialmente explosivas, en las cañerías de cobre y plomo.

Substrato quimioluminiscente: Evitar la contaminación y exposición a la luz directa del sol. (Ver el prospecto).

Agua: Usar agua destilada o desionizada.

Materiales Suministrados

Los componentes representan un juego completo. Las etiquetas incluidas en la caja son necesarias para el ensayo.

Cartucho de bolas de Homocisteína (L2HO12)

Con código de barras. 200 bolas, recubiertas con S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KHO2: 1 cartucho.

Vial de reactivo de Homocisteína (L2HOA2)

Con código de barras. Un cartucho, contiene 3 reactivos: 15,5 ml S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa bobina en buffer con conservantes, 4,5 ml de ditiotritol (DTT) en buffer, y 11,5 ml de fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con anticuerpo monoclonal anti-SAH de ratón en buffer. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad.

L2KHO2: 1 vial.

Antes de usar, cortar la parte superior de la etiqueta en la perforación, sin dañar el código de barras. Quitar el precinto del orificio del vial; encajar la cubierta deslizante en las rampas de la tapa del reactivo.

Ajustadores de Homocisteína (LHOL, LHOH)

Dos viales ámbar (bajo y alto), con 2,0 ml cada uno, de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) derivada sintéticamente en una matriz de proteína/buffer. Estable a 2–8°C durante 30 días después de abrirse, o hasta 6 meses (alícuotados) a –20°C.

L2KHO2: 1 juego.

Antes de hacer un ajuste, colocar las etiquetas a las alícuotas apropiadas (suministradas con el kit) sobre tubos de ensayo, de forma tal que los códigos de barras puedan ser leídos por el lector.

Componentes del kit que se suministran por separado

Diluyente de Homocisteína (L2HOZ)

Para la dilución de muestras de alta concentración dentro del equipo. 25 ml de un concentrado listo para usarse, de una matriz proteica libre de Homocisteína. Conservación: 30 días (después de su apertura) a 2–8°C o 6 meses (aliquotado) a –20°C.

Se suministran etiquetas con códigos de barras para usarse con este diluyente. Antes de uso, colocar la etiqueta con el código de barras en un tubo de ensayo de 16 × 100 mm, así los códigos de barras pueden ser identificados por el lector del instrumento.

L2HOZ: 3 etiquetas

L2SUBM: Substrato quimioluminiscente

L2PWSM: Lavado de sonda

L2KPM: Kit de limpieza de sonda

LRXT: Tubos de reacción (desechables)

L2ZT: 250 Tubos De Prueba Del Diluyente De la Muestra (16 × 100 mm)

L2ZC: 250 Casquillos Del Tubo Del Diluyente De la Muestra

CCCM: Un módulo de control del marcador cardíaco de dos niveles y basado en suero no humano, que contiene cuatro constituyentes distintos, uno de los cuales es homocisteína.

También necesarios

Agua destilada o desionizada; tubos de reacción, controles.

Ensayo

Aviso: para obtener el funcionamiento óptimo, es importante realizar todos los procedimientos del mantenimiento general según lo definido en el manual del operador de IMMULITE 2000.

Consulte el Manual del operador de IMMULITE 2000 para: la preparación, instalación, ajuste, ensayo y procedimientos de control de calidad.

Intervalo de ajuste recomendado: 4 semanas.

Muestras de Control de Calidad: Utilizar controles o pools de sueros con al menos dos niveles diferentes de homocisteína (bajo y alto).

Valores Esperados

Los niveles de homocisteína pueden variar con la edad, sexo, área geográfica y factores genéticos, de manera que es importante para los laboratorios establecer sus propios rangos de referencia basados en su población local. En la bibliografía se sugiere un rango de referencia de 5 – 15 $\mu\text{mol/l}$ para adultos hombres y mujeres,¹¹ pero hay que tener en cuenta que los hombres tienden a mostrar niveles mas altos que las mujeres, y las mujeres postmenopausicas mas altos que las premenopausicas.¹²

120 muestras de sujetos adultos, hombres y mujeres aparentemente sanos de edad 22–66 fueron analizados usando el kit de Homocisteína IMMULITE 2000. Las muestras tomadas en tubos de plasma heparinizado y conservadas en hielo previa separación del plasma de las células. El valor medio fue 7,7 $\mu\text{mol/l}$, con un rango central del 95%

5,0 – 12 $\mu\text{mol/l}$.

Estos límites han de considerarse sólo como una guía. Cada Laboratorio deberá establecer sus propios rangos de referencia.

Limitaciones

Muestras de pacientes con terapia farmacológica que involucre a la S-adenosil-metionina puede mostrar niveles de homocisteína falsamente elevados.

Aunque el análisis de los compuestos de la familia de la carbamacepina, fenitoina, 6-azuridina y antopterina indican que no existen las reacciones cruzadas, las muestras de pacientes sometidos a tratamientos con estas drogas, así como con metotrexato, óxido nítrico y otros anticonvulsivos, deben ser interpretadas con precaución, ya que dichas sustancias han mostrado interferencias con determinados ensayos de homocisteína.

Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas de los componentes del ensayo provocando interferencias con los inmunoanálisis in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Las muestras de los pacientes que frecuentemente están expuestos a animales o a productos

séricos animales pueden presentar este tipo de interferencia que potencialmente ocasione un resultado anómalo. Estos reactivos han sido formulados para minimizar el riesgo de interferencia, no obstante, pueden darse interacciones anómalas entre sueros conflictivos y los componentes del ensayo. Con fines de diagnóstico, los resultados obtenidos con este ensayo siempre deben ser usados en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y cualquier otro dato clínico relevante.

Características Analíticas

Para ver resultados *representativos* de las cualidades del ensayo ver las tablas y los gráficos. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol/l}$. (a menos que se indique lo contrario, los resultados fueron obtenidos a partir de muestras de plasma heparinizado.)

Rango de Calibración: 2 – 50 $\mu\text{mol/l}$

Sensibilidad: 0,5 $\mu\text{mol/l}$

Precisión: Las muestras fueron procesadas en cuadruplicado durante varios días, para un total de 20 tandas y 80 replicados. (Ver la tabla de "Precision").

Linealidad: Las muestras fueron analizadas en varias diluciones. (Ver la tabla de "Linearity" para resultados representativos.)

Recuperación: Se analizaron muestras sobrecargadas 1 en 19 con tres soluciones (125, 250 y 500 $\mu\text{mol/l}$). (Ver la tabla de "Recovery" para resultados representativos.)

Especificidad: El ensayo es altamente específico para homocisteína (Ver la tabla de "Specificity").

Bilirrubina: La presencia de bilirrubina conjugada y no conjugada, en concentraciones hasta 200 mg/l, no tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Hemólisis: La presencia de hemoglobina, en concentraciones hasta 512 mg/dl, no tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Lipemia: La presencia de triglicéridos en concentraciones hasta 3 000 mg/dl no tiene efecto alguno en los resultados, en

lo correspondiente a la precisión del ensayo.

Tipo de muestra alternativa: Para determinar si el suero puede ser utilizado con el kit de homocisteína IMMULITE 2000, la sangre fue recogida en hielo a partir de 34 voluntarios dentro tubos vacutainer con heparina, EDTA y vacíos. Se separó las células de las muestras, y fueron cargadas con homocisteína y ensayadas con el kit de Homocisteína IMMULITE 2000, con los siguientes resultados.

(EDTA) = 0,98 (Heparin) + 0,85 $\mu\text{mol/l}$
r = 0,954

(Serum) = 1,02 (Heparin) – 0,53 $\mu\text{mol/l}$
r = 0,975

Medias:
20,2 $\mu\text{mol/l}$ (Heparin)
20,7 $\mu\text{mol/l}$ (EDTA)
20,1 $\mu\text{mol/l}$ (Serum)

Para asegurar el efecto de la temperatura de conservación, los tubos vacutainer heparinizados, EDTA y vacíos fueron recogidos de cinco voluntarios para cada tipo de tubo. Algunos tubos fueron conservados a temperatura ambiente, mientras que otros fueron conservados en hielo para varios periodos de tiempo previamente a la separación. Los gráficos muestran el efecto del tiempo de conservación y la temperatura para heparina, EDTA suero. (Ver gráficos 1-3).

Método Comparativo 1: El ensayo fue comparado con un método enzimo inmunoensayo manual comercialmente disponible (Kit A) en 168 muestras de plasma (Rango de concentración: aproximadamente de 4 a 43 $\mu\text{mol/l}$. Ver el gráfico "Method Comparison 1.") Por regresión lineal:

(IML 2000) = 1,0 (Kit A) + 0,24 $\mu\text{mol/l}$
r = 0,966

Medias:
12,9 $\mu\text{mol/l}$ (IMMULITE 2000)
12,7 $\mu\text{mol/l}$ (Kit A)

Método Comparativo 2: El ensayo fue también comparado con HPLC método usado en un laboratorio de referencia en Estados Unidos, en 95 muestras de plasma heparinizado (Rango de concentración: aproximadamente de 4 a 44 $\mu\text{mol/l}$. Ver el gráfico "Method Comparison 2.") Por regresión lineal:

(IML 2000) = 0,97 (HPLC) + 0,71 $\mu\text{mol/l}$
r = 0,974

Medias:

13,4 µmol/l (IMMULITE 2000)
13,2 µmol/l (HPLC)

Método comparativo 3: El ensayo fue comparado con otro inmunoensayo (Kit B) comercialmente disponible en 113 muestras de plasma (Rango de concentración: aproximadamente de 4 a 23 µmol/l. Ver el gráfico "Method Comparison 3.") Por regresión lineal:

(IML 2000) = 0,90 (Kit B) – 0,02 µmol/l
r = 0,925

Medias:

8,7 µmol/l (IMMULITE 2000)
9,6 µmol/l (Kit B)

Asistencia técnica

Contacte con su Distribuidor Nacional.

El Sistema de Calidad de Diagnostic Products Corporation está registrado para la ISO 13485:2003.

Français

IMMULITE 2000 Homocystéine

Domaine d'utilisation : Pour le dosage quantitatif de la L-homocystéine dans le plasma ou le sérum humain. Ce test est réservé à un usage *in vitro* diagnostic avec l'Analyseur IMMULITE 2000 et constitue une aide au diagnostic et au suivi de patients atteints d'hyperhomocystéinémie ou d'homocystinurie.

Référence catalogue: **L2KHO2** (200 tests)

Code produit : **HCY**

Code couleur: **Gris foncé**

Attention: Les échantillons provenant de patients recevant un traitement par de la S-adenosyl-méthionine peuvent donner des résultats d'homocystéine faussement augmentés.

Les résultats provenant de patients prenant l'un des médicaments suivants méthotrexate, carbamazépine, phénytoïne, oxide nitreux, anti-convulsivants ou 6-azauridine triacétate doivent être interprétés avec précaution car ces substances interfèrent avec le dosage de l'homocystéine.

Introduction

L'homocystéine totale (tHcy) a émergé comme facteur de risque important dans l'évaluation des maladies cardiovasculaires.^{3-7,12} L'Hcy, un acide aminé contenant un résidu thiol, est produite par la déméthylation intracellulaire de la méthionine. L'Hcy sert ainsi de réserve qui peut ensuite être utilisée pour la production soit de méthionine sous l'action d'une enzyme folates dépendante, la méthionine synthétase, soit de cystéine en utilisant la voie de transulfuration B6 dépendante.^{1,2} L'Hcy plasmatique se trouve principalement sous forme liée à une protéine, néanmoins des formes libre, oxydée et disulfure sont également présentes.

Des concentrations de tHcy très élevées se trouvent chez des patients atteints d'homocystinurie, une maladie génétique rare concernant les enzymes impliquées dans le métabolisme de l'Hcy.^{1,2,3} Les patients atteints d'homocystinurie présentent des pathologies thromboemboliques artérielles, un retard mental et une artériosclérose précoce.¹ D'autres maladies génétiques moins graves sont également associées à des taux modérés d'Hcy.^{3,4,5}

L'homocystéine a été identifiée comme marqueur de maladies cardiovasculaires. Une méta-analyse de 27 études épidémiologiques a suggéré qu'une augmentation de 5 µmol/l en Hcy pourrait être associé à un facteur de risque de maladies coronariennes artérielles (CAD) de 1,6 pour les hommes et 1,8 pour les femmes, soit la même augmentation de risque qu'une augmentation de 0,5 mmol/l du cholestérol.⁷ De plus, les patients atteints de pathologie rénale chronique aggravée par une maladie cardiovasculaire athérosclérotique présentent des taux d'Hcy élevés dus à l'incapacité du rein à éliminer l'Hcy du sang.^{1,2,3}

Principe du test

Immunodosage par compétition

L'IMMULITE 2000 réalise un cycle de prétraitement à bord des échantillons plasmatiques ou sériques par la solution de S-adenosyl-L-homocystéine (SAH) hydrolase et de dithiothreitol (DTT) dans un

godet réactionnel ne contenant pas de bille. Après une incubation de 30 minutes, l'échantillon prétraité est transféré dans un second tube contenant une bille de polystyrène revêtue de SAH et un anticorps spécifique de SAH. Pendant une incubation de 30 minutes, le SAH modifié provenant de l'échantillon prétraité entre en compétition avec le SAH fixé pour se lier à l'anticorps anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline. Le conjugué non lié est éliminé par lavage et séparation par ultracentrifugation. Le substrat est ajouté et la procédure continue comme décrite pour les immunodosages classiques dans le Manuel d'Utilisation.

Cycles d'incubation : 2 × 30 minutes. 2 positions d'incubation par dosage : 1 godet pour le prétraitement; 1 godet pour la réaction immunologique.

Cycle 1: Libération de l'homocystéine liée et transformation en SAH.

Cycle 2: Réaction immunologique.

Recueil des échantillons

Les plasmas hépariné ou EDTA sont particulièrement recommandés, mais le sérum est également utilisable. Il est important de séparer le plasma ou sérum des cellules dès que possible après prélèvement, car la synthèse d'Hcy peut avoir lieu dans les hématies après le prélèvement. **Les échantillons doivent être conservés dans la glace entre le prélèvement et la centrifugation.** Noter que la conservation sur glace rend particulièrement difficile l'utilisation d'échantillons sériques.

Il est recommandé de clarifier les échantillons hyperlipémiques par ultracentrifugation.

Des échantillons hémolysés peuvent être révélateurs d'une préparation inadéquate du prélèvement avant son envoi au laboratoire ; il faudra donc interpréter les résultats avec prudence.

La centrifugation des échantillons sériques avant la formation complète du caillot peut entraîner la présence de fibrine. Pour éviter les résultats erronés dus à la présence de fibrine, s'assurer de la formation complète du caillot avant de centrifuger les échantillons. Certains échantillons, en particulier ceux provenant de patients sous anti-coagulants, peuvent

nécessiter un temps plus long pour la formation du caillot.

Des tubes pour prélèvements sanguins provenant de fabricants différents peuvent donner des résultats différents, selon les matériaux et additifs utilisés, y compris gels ou barrières physiques, activateurs de la coagulation et/ou anticoagulants. Le coffret Homocystéine IMMULITE 2000 n'a pas été testé sur tous les types de tubes possibles. Veuillez consulter le chapitre intitulé Autres Types d'Échantillons pour plus de renseignements sur les tubes qui ont été évalués.

Volume nécessaire: 15 µl de plasma ou de sérum.

Conditions de conservation: 14 jours à +2°C/+8°C ou 6 mois à -20°C.

Précautions d'emploi

Réservé à un usage diagnostique *in vitro*.

Réactifs : conserver les réactifs à +2/+8 °C. Éliminer les déchets conformément à la réglementation en vigueur.

Respecter les précautions d'emploi et manipuler tous les composants du coffret comme des produits potentiellement infectieux. Les réactifs dérivés de produits humains et utilisés dans ce coffret ont subi un test sérologique pour la Syphilis et des tests de dépistage pour les anticorps anti-VIH1 et 2, anti-HCV et pour l'antigène de surface de l'hépatite B, qui se sont tous avérés négatifs.

De l'azide de sodium à des concentrations inférieures à 0,1 g/dl a été ajouté comme conservateur ; lors de l'élimination, l'évacuer avec de grandes quantités d'eau pour éviter une accumulation d'azides métalliques explosifs dans les canalisations.

Substrat chimiluminescent : éviter la contamination et l'exposition directe au soleil. (Voir notice).

Eau : utiliser de l'eau distillée ou désionisée.

Matériel fourni

Les composants de la trousse ne peuvent être utilisés que conjointement. Les étiquettes à l'intérieur du coffret sont nécessaires au dosage.

Cartouche de Billes Homocystéine (L2HO12)

Avec code-barre. 200 billes revêtues de S-adenosyl-L-homocystéine (SAH). Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption.
L2KHO2: 1 cartouche.

Cartouche-Réactif Homocystéine (L2HOA2)

Avec code-barre. Une cartouche contenant 3 réactifs: 15,5 ml de S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase bovine dans un tampon avec conservateur. 4,5 ml de dithiothreitol (DTT) dans un tampon. 11,5 ml d'anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline (intestins de veau) dans un tampon. Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption.
L2KHO2: 1 cartouche.

Avant l'emploi, retirer la partie supérieure de l'étiquette au niveau des perforations en ayant soin de ne pas endommager le code-barres. Retirer le film protecteur situé sur la partie supérieure de la cartouche-réactif ; insérer le couvercle coulissant entre les glissières sur le dessus de la cartouche-réactif.

Ajusteurs Homocystéine (LHOL, LHOH)

Deux flacons de couleur ambre "Haut" et "Bas", 2,0 ml chacun, de S-adenosyl-L-homocystéine (SAH) synthétique dans une matrice protéine/tampon. Stable à +2°C/+8°C 30 jours après ouverture ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.
L2KHO2: 1 jeu.

Avant de procéder à un ajustement, placer les étiquettes correspondant à l'aliquot (fournies avec le coffret) sur des tubes en verre de sorte que les code-barres soient lisibles par le lecteur.

Composants du coffret fournis séparément

Diluant échantillon homocystéine (L2HOZ)

Pour la dilution à bord des échantillons de concentration élevée. 25 ml d'un concentré prêt à l'emploi de matrice tampon/ protéines, exempte de homocystéine. Conservation : 30 jours après ouverture à +2°C/+8°C ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

Les étiquettes code-barres sont fournies avec le Diluant. Avant utilisation, placer

l'étiquette appropriée sur un tube de 16×100 mm de façon que le code-barre puisse être lu par le lecteur de l'appareil.

L2HOZ : 3 étiquettes

L2SUBM : Substrat chimiluminescent

L2PWSM : Solution de lavage

L2KPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LRXT : Godets réactionnels (jetables)

L2ZT : 250 Tubes À essai De Diluant échantillon (16 × 100 mm)

L2ZC : 250 Bouchons pour tubes de diluants

CCCM : Contrôle Marqueurs Cardiaques à deux niveaux, à base de sérum non humain, dont l'un des quatre constituants est la homocystéine.

Egalement requis

Eau distillée ou désionisée ; tubes ; contrôles

Protocole de dosage

Noter que pour des performances optimales, il est important de réaliser toutes les procédures de maintenance de routine selon les instructions du Manuel d'Utilisation IMMULITE 2000.

Se reporter au manuel d'utilisation de l'IMMULITE 2000 pour : la préparation, le démarrage du système, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

Intervalle d'ajustement recommandé : 4 semaines.

Echantillons pour le contrôle de qualité :

Utiliser des contrôles ou des pools de sérums avec au moins deux niveaux de concentration (faible ou élevé) d'homocystéine.

Valeurs attendues

Les taux d'homocystéine peuvent varier avec l'âge, le sexe, le lieu géographique et les facteurs génétiques, aussi il est important pour les laboratoires d'établir leurs propres valeurs de référence en fonction de la population locale. La littérature suggère un domaine de référence de 5 – 15 µmol/l pour les hommes et femmes adultes,¹¹ mais fait également remarquer que les hommes ont tendance à avoir des taux plus élevés que les femmes et que les femmes ménopausées ont tendance à avoir des

taux plus élevés que les femmes non ménopausées.¹²

Cent vingt échantillons provenant d'hommes et de femmes adultes apparemment en bonne santé (âgés de 22 à 66 ans) ont été analysés avec le test IMMULITE 2000 Homocystéine. Les échantillons ont été prélevés sur tubes héparinés et conservés dans la glace avant la séparation du plasma et des cellules. La valeur médiane était 7,7 µmol/l, avec un domaine centré à 95% de

5,0 – 12 µmol/l.

Utiliser ces valeurs à *titre indicatif* uniquement. Chaque laboratoire devrait établir ses propres valeurs de référence.

Limites

Les échantillons provenant de patients suivant une thérapie médicamenteuse comprenant du S-adenosyl-méthionine peuvent donner des résultats d'homocystéine faussement élevés.

Bien que l'analyse de composés apparentés à la carbamazépine, à la phénytoïne, à la 6-azauridine et à l'anthoptérine n'indique pas de réaction croisée, les échantillons prélevés sur des patients traités avec l'un de ces médicaments ainsi qu'avec du méthotrexate, de l'oxyde nitreux ou tout autre anti-convulsivant, doivent être interprétés avec précaution, ces substances montrant des interférences avec certains tests de l'homocystéine

Les anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines faisant partie des composants du coffret et interférer avec les immunodosages in vitro. [Voir Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Les échantillons provenant de patients fréquemment exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent présenter ce type d'interférence pouvant potentiellement donner un résultat anormal. Ces réactifs ont été mis au point afin de minimiser le risque d'interférence, cependant des interactions potentielles entre des sérums rares et les composants du test peuvent se produire. Dans un but diagnostique, les résultats obtenus avec

ce dosage doivent toujours être utilisés en association avec un examen clinique, l'histoire médicale du patient et d'autres résultats.

Performances du test

Consulter les tableaux et graphiques pour obtenir les données *représentatives* des performances du test. Les résultats sont donnés en µmol/l. (En l'absence de précision supplémentaire, tous les résultats ont été obtenus sur des échantillons de plasma hépariné).

Domaine de mesure: 2 à 50 µmol/l.

Sensibilité analytique: 0,5 µmol/l

Précision: Les échantillons ont été dosés en quadruplet pendant plusieurs jours, soit un total de 20 séries et de 80 résultats. (Voir le tableau "Precision".)

Linéarité : les échantillons ont été testés avec des taux de dilution variés (Voir le tableau "Linearity".)

Récupération: les échantillons testés ont été chargés dans un rapport de 1 à 19 avec trois solutions d'homocystéine (125, 250 et 500 µmol/l). (Voir le tableau "Recovery".)

Spécificité: L'anticorps est hautement spécifique de l'homocystéine. (Voir le tableau "Specificity".)

Bilirubine: La présence de bilirubine conjuguée et non conjuguée ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 200 mg/l.

Hémolyse: La présence d'hémoglobine ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 512 mg/dl.

Lipémie : La présence de triglycérides jusqu'à une concentration de 3 000 mg/dl n'interfère ni sur la précision du dosage, ni sur les résultats.

Autres types d'échantillons: Pour s'assurer que le sérum peut être utilisé avec le dosage IMMULITE 2000 Homocystéine, du sang a été prélevé auprès de 34 volontaires sur tubes vacutainer sec, hépariné et EDTA, mis immédiatement sur la glace. Les échantillons ont été séparés des cellules et les échantillons appariés ont été chargés d'homocystéine puis dosés par la

méthode IMMULITE 2000 Homocystéine avec les résultats suivants.

(EDTA) = 0,98 (Héparine) + 0,85 µmol/l
r = 0,954

(Sérum) = 1,02 (Héparine) – 0,53 µmol/l
r = 0,975

Moyennes:

20,2 µmol/l (Héparine)
20,7 µmol/l (EDTA)
20,1 µmol/l (Sérum)

Pour évaluer l'effet de la température de conservation, des tubes héparinés, avec EDTA et secs ont été prélevés pour chaque type de tube auprès de 5 volontaires. Certains tubes ont été gardés à température ambiante, tandis que les autres étaient gardés dans la glace pendant des périodes de temps variables *avant la séparation*. Les graphiques ci-dessous montrent l'effet du temps et de la température de conservation pour le sérum et les plasmas hépariné ou EDTA. (Voir graphiques 1-3).

Comparaison de méthode 1: Le dosage a été comparé à un immunodosage enzymatique manuel disponible dans le commerce (coffret A) sur 168 échantillons plasmatiques (dont les concentrations allaient d'environ 4 à 43 µmol/l. Voir le graphique "Method Comparison 1.") Par régression linéaire :

(IML 2000) = 1,0 (Coffret A) + 0,24 µmol/l
r = 0,966

Moyennes:

12,9 µmol/l (IMMULITE 2000)
12,7 µmol/l (Coffret A)

Comparaison de méthode 2: Le test a également été comparé à une méthode "maison" HPLC utilisée dans un laboratoire de référence des Etats-Unis sur 95 échantillons de plasma hépariné (dont les concentrations allaient d'environ 4 à 44 µmol/l. Voir le graphique "Method Comparison 2.") Par régression linéaire :

(IML 2000) = 0,97 (HPLC) + 0,71 µmol/l
r = 0,974

Moyennes:

13,4 µmol/l (IMMULITE 2000)
13,2 µmol/l (HPLC)

Comparaison de méthode 3: Le dosage a été comparé à un autre immunodosage disponible dans le commerce (Coffret B) sur 113 échantillons plasmatiques (dont les concentrations allaient d'environ 4 à 23 µmol/l. Voir le graphique "Method Comparison 3.") Par régression linéaire :

(IML 2000) = 0,90 (Coffret B) – 0,02 µmol/l
r = 0,925

Moyennes:

8,7 µmol/l (IMMULITE 2000)
9,6 µmol/l (Coffret B)

Assistance technique

Contactez votre distributeur national. En France distribué par DPC France 90 bd National 92257 La Garenne-Colombes.

Le système d'assurance qualité de DPC est certifié ISO 13485 (2003).

Italiano

Omocisteina

Uso: A solo uso diagnostico *in vitro* con l'analizzatore del sistema IMMULITE 2000 nella determinazione quantitativa dell'Omocisteina nel plasma o nel siero umano. Questo dispositivo costituisce un ausilio nel trattamento di pazienti con sospetta Iperomocisteinemia o omocisteinuria.

Codice: **L2KHO2** (200 test)

Codice del Test: **HCY**

Colore: **Grigio Scuro**

Attenzione: campioni di pazienti che assumono farmaci contenenti adenosil-metionina possono presentare livelli falsamente elevati di omocisteina.

Risultati su campioni ottenuti da pazienti che assumono metotrexato, carbamazepina, fenitoina, ossido di nitro, ed anti-convulsivi, o 6-triacetato di azauridina dovrebbero essere interpretati con cautela poiché queste sostanze interferiscono con la determinazione dell'Omocisteina.

Riassunto e spiegazione del Test

L'omocisteina totale (tHcy) è emersa come un importante fattore di rischio nella determinazione delle malattie cardiovascolari.^{3-7,12} L'Hcy, un aminoacido che contiene tiolo è prodotto dalla demetilazione della metionina. L'Hcy quindi viene utilizzata nella riformazione della

metionina attraverso l'azione della metionina sintetasi un enzima folato-dipendente o della cisteina utilizzando il percorso di transulfurazione B6 dipendente.^{1,2} L'Hcy nel plasma si riscontra principalmente in una forma legata alle proteine, ma sono anche presenti forme libere, ossidate e disolforiche.

Livelli molto elevati di tHcy sono riscontrati in pazienti affetti da omocistinuria, una malattia genetica rara degli enzimi legata al metabolismo dell'Hcy.^{1,2,3} Pazienti affetti da omocistinuria presentano tromboembolia arteriosa, ritardo mentale e arteriosclerosi precoce.⁴ Difetti genetici più lievi sono anche associati con livelli moderati di Hcy.^{3,4,5}

L'Omocisteina è stata identificata come un indicatore di malattie cardiovascolari. Una meta-analisi di 27 studi epidemiologici ha suggerito che un incremento di 5 µmol/L nel tHcy potrebbe essere associato con strane percentuali nelle malattie coronarico-arteriose (CAD) di 1,6 per gli uomini e 1,8 per le donne, lo stesso aumento nel fattore di rischio rappresentato dall'aumento dello 0,5 mmol/L del colesterolo.⁷ Inoltre pazienti con patologie renali croniche complicate da malattie arteriosclerotiche e cardiovascolari presentano valori elevati di tHcy dovuti all'incapacità da parte dei reni di eliminare l'Hcy dal sangue.^{1,2,3}

Principio del Metodo

Dosaggio immunologico competitivo.

L'IMMULITE 2000 effettua un ciclo on-line di pretrattamento del campione di plasma o di siero con S-adenosil-L-omocisteina (SAH) idrolasi ed una soluzione di ditiotreitolo (DTT) in una provetta di reazione che non contiene sferette. Dopo un'incubazione di 30 minuti, il campione trattato viene trasferito in una seconda provetta di reazione contenente una sferetta di polistirene coattata con SAH ed un anticorpo specifico per la SAH marcato con fosfatasi alcalina. Durante un'incubazione di 30 minuti, la SAH convertita dal pretrattamento del campione compete con la SAH immobilizzata per legarsi con l'anticorpo anti-SAH marcato con fosfatasi alcalina. Il coniugato enzimatico non legato verrà eliminato attraverso centrifugazione. Viene aggiunto il

substrato e la procedura continua come descritto dal Manuale dell'Operatore.

Cicli di Incubazione: 2 × 30 minuti. 2 posizioni test per dosaggio: 1 vassoio per il trattamento del campione; 1 vassoio di reazione.

Ciclo 1: Rilascio dell'omocisteina legata e conversione in SAH.

Ciclo 2: Immunoreazione.

Raccolta del Campione

Preferibilmente utilizzare plasma eparinizzato ed EDTA, ma è utilizzabile anche il siero. E' importante separare il plasma o il siero dalle cellule prima possibile dopo il prelievo, poichè la sintesi dell'HCY avviene nei globuli rossi dopo il prelievo. **I campioni devono essere conservati in ghiaccio tra il prelievo e la centrifugazione.** Notare che la conservazione nel ghiaccio rende l'utilizzo dei campioni di siero particolarmente difficile.

Si consiglia l'utilizzo di un'ultracentrifuga per schiarire i campioni lipemici.

I campioni emolizzati posson indicare il trattamento non idoneo del campione prima dell'arrivo al laboratorio; per questo motivo, i risultati devono essere interpretati con prudenza.

La centrifugazione dei campioni del siero prima che la coagulazione sia completa può produrre fibrina. Per evitare risultati errati dovuti alla presenza di fibrina, assicurarsi che il processo di coagulazione sia completo prima di centrifugare i campioni. Alcuni campioni, in modo particolare quelli di pazienti sottoposti a terapia con anticoagulanti, possono richiedere tempi di coagulazione più lunghi.

Provette per il prelievo di sangue di produttori diversi possono dare valori differenti, a seconda dei materiali e degli additivi usati, incluso gel o barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti. L'IMMULITE 2000 Omocisteina non è stato verificato con tutte le possibili variazioni di tipi di provette. Consultare la sezione riguardante Campioni Alternativi per dettagli sulle provette testate.

Volume richiesto: 15 µL di plasma o siero

Conservazione: 14 giorni a 2–8°C o 6 mesi a –20°C.

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare i reagenti a 2–8°C. Eliminare in conformità alle leggi vigenti.

Seguire le precauzioni universali, e maneggiare tutti i componenti come se fossero capaci di trasmettere agenti infettivi. Sono stati analizzati i materiali di sorgente dal sangue umano e sono stati trovati non reattivi per sifilide; per anticorpi ad HIV 1 e 2; per l'antigene superficiale dell'epatite B; e per anticorpi all'epatite C.

E' stata aggiunta Sodio Azide a concentrazioni inferiori a 0,1 g/dL come conservante. Al momento dell'eliminazione, irrorare con molta acqua per evitare la formazione di azidi metalliche potenzialmente esplosive nelle tubature di piombo e di rame.

Substrato Chemiluminescente: Evitare la contaminazione e l'esposizione alla luce solare diretta. (Vedi metodica.)

Acqua: Utilizzare solo acqua distillata o deionizzata.

Materiali Forniti

I componenti costituiscono un unico set. Le etichette all'interno della confezione sono necessarie per eseguire i dosaggi.

Contenitore di Sferette Omocisteina (L2HO12)

Con codice a barre. 200 sferette coattate con S-adenosil-L-omocisteina (SAH). Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. **L2KHO2:** 1 confezione.

Porta Reagente Omocisteina (L2HOA2)

Con codici a barre. Un porta reagenti, contenente 3 reagenti: 15,5 mL di idrolasi S-adenosil-L-omocisteina bovina in un tampone con conservanti, 4,5 mL di ditiotreitolo (DTT) in un tampone, e 11,5 mL di fosfati alcalina (intestino di vitello) coniugata con un anticorpo monoclonale murino anti-SAH in un tampone. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

L2KHO2: 1 Porta Reagente

Prima dell'utilizzo rimuovere la parte superiore dell'etichetta lungo la

perforazione senza danneggiare il codice a barre. Togliere il foglio protettivo dalla parte superiore del flacone. Far scattare nella corretta posizione il coperchio scorrevole lungo le guide del coperchio del reagente.

Calibratori Omocisteina (LHOL, LHOH)

Due flaconi ambrati (Basso ed Alto), 2,0 mL ciascuno, di S-adenosil-L-omocisteina (SAH) sintetica in un tampone/matrice proteico. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura, o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

L2KHO2: 1 set.

Prima di ricalibrare collocare le etichette giuste sulle provette delle aliquote (fornite col kit) cosicché i codici a barre possano essere registrati dal lettore.

Componenti del kit forniti separatamente

Diluente dell'Omocisteina (L2HOZ)

Per la diluizione sul luogo dei campioni ad elevata concentrazione. 25 mL di un tampone/matrice proteico concentrato pronto all'uso, privo di omocisteina. Conservazione: 30 giorni (dopo l'apertura) a 2–8°C oppure 6 mesi (in aliquote) a –20°C.

Vengono Fornite Le provette da utilizzarsi con il diluente. Prima dell'utilizzo, collocare un'etichetta appropriata su una provetta 16 × 100 mm cosicché i codici a barre possano essere letti dal lettore interno

L2HOZ: 3 etichette

L2SUBM: Substrato Chemiluminescente

L2PWSM: Tampone di lavaggio dell'Ago

L2KPM: Kit di Pulizia dell'Ago

LRXT: Tubi di Reazione (monouso)

L2ZT: 250 Provette (16 x 100 mm) per Diluente del Campione

L2ZC: 250 Tappini per Provette per Diluente del Campione

CCCM: controllo a due livelli di siero non umano contenente quattro costituenti diversi tra cui la omocisteina.

Materiali richiesti

Acqua distillata o deionizzata, provette, controlli.

Procedura del Dosaggio

Attenzione: per avere prestazioni ottimali, è importante effettuare le procedure di manutenzione di routine cosiccome definito nel Manuale dell'Operatore dell'IMMULITE 2000.

Consultare il Manuale d'Uso IMMULITE 2000 per: preparazione, messa a punto, diluizioni, calibrazione, dosaggi e procedure di controllo di qualità.

Intervallo di Calibrazione Consigliato: 4 settimane.

Controllo di Qualità: Utilizzare controlli o pool di sieri con almeno due livelli (Alto e Basso) di Omocisteina.

Valori Attesi

I livelli di Omocisteina possono variare con l'età, il sesso, l'area geografica ed i fattori genetici, quindi, è importante che i laboratori stabiliscano i loro range di riferimento sulla base della loro popolazione locale. La letteratura suggerisce un range di riferimento da 5 a 15 $\mu\text{mol/L}$ per gli uomini e le donne adulti,¹¹ ma fa anche notare che gli uomini tendono ad avere livelli più elevati delle donne e che le donne in postmenopausa tendono ad avere livelli più elevati che in premenopausa.¹²

120 campioni di adulti volontari uomini e donne in apparente buono stato di salute, (età 22–66) sono stati testati utilizzando il dosaggio IMMULITE 2000 Omocisteina. I campioni sono stati prelevati in provette eparinizzate e conservati nel ghiaccio prima della separazione del plasma dalle cellule. Il valore mediano era 7,7 $\mu\text{mol/L}$, con un range centrale 95% di

5,0 – 12 $\mu\text{mol/L}$.

Detti valori dovrebbero essere considerati solo come *suggerimento*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Limiti

I campioni di pazienti sottoposti a terapia con farmaci che includono la S-adenosil-metionina possono presentare livelli falsamente elevati di omocisteina.

Benchè l'analisi di composti progenitori della carbamazepina, della fenitoina, della 6-azauridina e dell'antopterina indichino che non è presente nessuna

crossreattività, i campioni ottenuti da pazienti trattati con questi farmaci cosiccome con il metotrexato, l'ossido di nitro ed altri anticonvulsivi, dovrebbero essere interpretati con cautela poichè è stato dimostrato che queste sostanze interferiscono con alcuni dosaggi dell'omocisteina.

Gli anticorpi eterofili presenti nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro. [Vedi Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem 1988;34:27-33.] Campioni di pazienti routinariamente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero di animali possono presentare questo tipo di interferenza causa potenziale di risultati anomali. Questi reagenti sono stati formulati per minimizzare il rischio di interferenze, tuttavia, possono verificarsi interazioni potenziali tra sieri rari e componenti del test. A scopo diagnostico, i risultati ottenuti da questo dosaggio devono sempre essere utilizzati unitamente all'esame clinico, all'anamnesi del paziente e ad altre indagini di laboratorio.

Prestazioni del Dosaggio

Vedi tavole e grafici per dati *rappresentativi*. I risultati sono indicati in $\mu\text{mol/L}$. (Se non diversamente notato, tutti i risultati sono stati generati da campioni di plasma eparinizzato).

Range di calibrazione: 2 – 50 $\mu\text{mol/L}$

Sensibilità analitica: 0,5 $\mu\text{mol/L}$

Precisione: i campioni sono stati ripetutamente dosati in quadruplicato nel corso di più giorni, per un totale di 20 sedute e 80 replicati. (vedi la tabella "Precision").

Linearità: Sono stati dosati campioni in varie forme diluite. (Vedi la Tabella "Linearity" per dati rappresentativi.)

Recupero: Sono stati dosati campioni 1:19 ai quali sono state aggiunte tre soluzioni (125, 250 e 500 $\mu\text{mol/L}$). (Vedi la Tabella "Recovery" per dati rappresentativi.)

Specificità: Il dosaggio è estremamente specifico per l'omocisteina (Vedi la Tabella "Specificity".)

Bilirubina: La presenza di bilirubina coniugata e non coniugata in concentrazioni fino a 200 mg/L non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Emolisi: La presenza di emoglobina in concentrazioni fino a 512 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Lipemia: La presenza di trigliceridi in concentrazioni fino a 3 000 mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.

Tipo di campioni alternativi: Per determinare se possa essere utilizzato siero con il kit IMMULITE 2000 Omocisteina, è stato effettuato un prelievo di sangue in ghiaccio da 34 volontari in provette semplici, eparinizzate ed EDTA. I campioni sono stati separati dalle cellule, ed ai campioni mescolati è stata aggiunta omocisteina. Gli stessi sono stati dosati con il dosaggio omocisteina IMMULITE 2000 con i seguenti risultati.

(EDTA) = 0,98 (Eparina) + 0,85 µmol/L
r = 0,954

(Siero) = 1,02 (Eparina) – 0,53 µmol/L
r = 0,975

Valore medio:
20,2 µmol/L (Eparina)
20,7 µmol/L (EDTA)
20,1 µmol/L (Siero)

Per determinare gli effetti della conservazione, sono stati effettuati prelievi a 5 volontari per tipo di provetta in provette semplici, eparinizzate ed EDTA. Alcune provette sono state conservate a temperatura ambiente, mentre altre sono state conservate in ghiaccio per un determinato periodo di tempo prima di effettuare la separazione. I grafici riportati di seguito mostrano gli effetti dei tempi di conservazione e delle temperature per campioni eparinizzati, EDTA e per il siero. (Vedi grafici 1-3).

Comparazione dei Metodi 1: Il dosaggio è stato comparato con un immunodosaggio manuale disponibile in commercio (Kit A) su 168 campioni di plasma (range di concentrazione: circa da 4 a 43 µmol/L. Vedi grafica "Method Comparison 1" Mediante regressione lineare:

(IML 2000) = 1,0 (Kit A) + 0,24 µmol/L
r = 0,966

Valore medio:
12,9 µmol/L (IMMULITE 2000)
12,7 µmol/L (Kit A)

Comparazione dei Metodi 2: Il dosaggio è stato anche comparato con un metodo in-house HPLC in uso presso un laboratorio di riferimento negli Stati Uniti su 95 campioni di plasma eparinizzato (Range di concentrazione: circa da 4 a 44 µmol/L. Vedi grafica "Method Comparison 2.") Mediante regressione lineare:

(IML 2000) = 0,97 (HPLC) + 0,71 µmol/L
r = 0,974

Valore medio:
13,4 µmol/L (IMMULITE 2000)
13,2 µmol/L (HPLC)

Comparazione dei Metodi 3: Il dosaggio è stato comparato con un altro immunodosaggio disponibile in commercio (Kit B) su 113 campioni di plasma. (Range di concentrazione: circa da 4–23 µmol/L. Vedi grafica "Method Comparison 3.") Mediante regressione lineare:

(IML 2000) = 0,90 (Kit B) – 0,02 µmol/L
r = 0,925

Valore medio:
8,7 µmol/L (IMMULITE 2000)
9,6 µmol/L (Kit B)

Assistenza Tecnica

All'estero: Si prega di contattare il proprio Distributore DPC Nazionale.

Il Sistema Qualità della Diagnostic Products Corporation è certificato secondo le norme ISO 13485:2003.

Português

Homocisteina

Utilização: Doseamento quantitativo da L-homocisteina em plasma ou soro humano, para uso diagnóstico *in vitro* com o analisador IMMULITE 2000. Este dispositivo pode auxiliar no diagnóstico e tratamento de doentes suspeitos de terem hiperhomocisteinemia ou homocistinúria.

Números de catálogo:
L2KHO2 (200 testes)

Código do teste: **HCY**
Cor: **Cinzentos escuros**

Precauções: Amostras de doentes sujeitos a terapias que envolvam S-adenosil-metionina podem apresentar níveis de homocisteína falsamente aumentados.

Amostras de doentes que tomem metotrexato, carbamazepina, fenitoína, óxido nítrico, anti-convulsantes ou triacetato 6-azauridina devem ser interpretados com cautela porque estas substâncias interferem com a determinação da homocisteína.

Sumário e explicação do teste

A homocisteína total (tHcy) tem emergido como importante factor de risco da doença cardiovascular.^{3-7,12} Hcy, um tiol contendo aminoácidos, é produzido pela desmetilação intracelular da metionina. Desse modo a Hcy funciona como um "pool" que pode ser depois usada na refabricação da metionina através da acção de um enzima folato dependente, metionina sintetase ou cisteína usando a via de transsulfuração dependente da B6.^{1,2} A Hcy no plasma encontra-se prioritariamente na forma de proteína ligada, mas as formas livre, oxidada e dissulfito também estão presentes.

Níveis muito elevados de Hcy são encontrados em doentes com homocistinúria, uma alteração genética grave do do enzimas envolvidos no metabolismo da Hcy.^{1,2,3} Os doentes com homocistinúria exibem tromboembolismo arterial, atraso mental e arterosclerose precoce.¹ Defeitos genéticos menos severos estão também associados com níveis moderados de Hcy.^{3,4,5}

Homocisteína tem sido identificada como um identificador da doença cardiovascular.

A meta-análise de 27 estudos epidemiológicos sugeriram que um aumento de 5 µmol/L na Hcy total pode ser associado com uma razão singular para a doença coronária arterial. De 1,6 para homem e 1,8 para mulher, o mesmo aumento em risco que um aumento de 0,5 mmol/L no colesterol.⁷

Adicionalmente, doentes com doença renal crónica complicada por doença cardiovascular arterioesclerótica

apresentam Hcy total elevada devido à impossibilidade do rim para remover Hcy do sangue.^{1,2,3}

Princípio do procedimento

Imunoensaio competitivo.

O IMMULITE 2000 realiza um ciclo de pretreamento da amostra de soro ou plasma do doente com S-adenosil-L-homocisteína (SAH) hidrolase e ditriotreitol (DTT) num tubo de reacção sem esfera. Após 30 minutos de incubação, a amostra tratada é transferida para um segundo tubo de reacção contendo uma esfera de poliestireno revestida com SAH e um anticorpo específico para SAH marcado com fosfatase alcalina. Durante os 30 minutos de incubação, a SAH convertida da amostra previamente tratada compete com a SAH imobilizada pela ligação ao anticorpo anti-SAH marcado com fosfatase alcalina. O conjugado enzimático não ligado é removido pela lavagem por centrifugação. Adiciona-se substrato e o procedimento continua como descrito para os imunoensaios típicos no Manual do Operador.

Ciclos de incubação: 2 × 30 minutos. 2 posições de teste por ensaio: 1 cuvete de pretreamento da amostra. 1 vaso de imunoreacção.

Ciclo 1: Libertação da homocisteína ligada e conversão em SAH.

Ciclo 2: Imunoreacção.

Colheita

É aconselhável usar plasma heparanizado ou com EDTA, mas também se pode usar soro. É importante separar o plasma ou soro dos glóbulos o mais rapidamente possível após a colheita. It is important to separate the serum from the cells as soon as possible after collection, uma vez que a síntese da Hcy ocorrerá nos glóbulos vermelhos após a colheita. **As amostras devem ser mantidas em gelo durante o processo de colheita e centrifugação.** Note que manter as amostras em gelo torna o uso de soro particularmente difícil.

Recomenda-se o uso de uma ultra centrífuga para clarear amostras lipémicas.

Amostras hemolisadas podem indicar tratamento incorrecto de uma amostra

antes do envio para o laboratório; portanto os resultados devem ser interpretados com cuidado.

A centrifugação de amostras de soro antes da formação completa do coágulo pode resultar na presença de fibrina. Para prevenir resultados errados devido à presença de fibrina, certifique-se que a formação do coágulo foi completa antes da centrifugação das amostras. Algumas amostras, em especial as de doentes que recebem terapia anticoagulante podem requerer um maior tempo de formação do coágulo.

Os tubos para colheita sanguínea de diferentes fabricantes, podem originar diferentes valores, dependendo dos materiais e aditivos, incluindo gel ou barreiras físicas, activadores do coágulo e/ou anti coagulantes. IMMULITE 2000 Homocisteína não foram ainda testados com todas as possíveis variações originadas pelos tipos de tubos. Consultar a secção Tipos de Amostras Alternativas para obter detalhes sobre os tubos que foram testados.

Volume de amostra: 15 µL de plasma ou soro.

Estabilidade: 14 dias a 2–8°C, ou 6 meses a –20°C.

Precauções

Para uso de diagnóstico *in vitro*.

Reagentes: Manter a 2–8°C. Elimine de acordo com as normas aplicadas.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas, obtidas de soro humano, foram testadas, revelando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV) 1 e 2; para o antigénio de superfície da hepatite B (HBsAg) e para os anticorpos do vírus da hepatite C.

Azida de sódio foi adicionada como conservante; para evitar acumulações de azidas metálicas explosivas em canalizações de cobre e alumínio, os reagentes devem ser rejeitados no esgoto apenas se estiverem diluídos e forem lavados com grandes volumes de água.

Substrato quimioluminescente: Evite contaminação e exposição directa à luz (ver bula).

Água: Utilize água destilada ou desionizada.

Materiais fornecidos

Os componentes formam um conjunto uno e indivisível. Os códigos de barras no interior das caixas são necessárias para o ensaio.

Embalagem de pérolas de Homocisteína (L2HO12)

Com códigos de barras. 200 pérolas, revestidas com S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Estável até a data de validade a 2–8°C.

L2KHO2: 1 Embalagem.

Embalagem de reagentes de Homocisteína (L2HOA2)

Com código de barras. Contém 3 reagentes: 15,5 mL de S-adenosil-L-homocisteína hidrolase bovina em tampão com conservante, 4,5 mL de ditiotreitól (DTT) em tampão, e 11,5 mL de fosfatase alcalina (de intestino de bezerro) conjugada com anti-SAH monoclonal de murino em tampão. Estável até a data de validade a 2–8°C.

L2KHO2: 1 embalagem.

Antes de utilizar, retire a etiqueta de protecção da tampa deslizante; levante a tampa, remova o remanescente da etiqueta com o cuidado de não danificar o código de barras. Remova o selo de alumínio do topo da embalagem, encaixe a tampa deslizante nas ranhuras e verifique se a tampa desliza.

Ajustes de Homocisteína (LHOL, LHOH)

Contém dois frascos (âmbar) (nível alto e baixo), 2,0 mL cada, de um derivado sintético de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) numa matriz proteica tamponizada. Estável, após a abertura, durante 30 dias a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

L2KHO2: 1 conjunto.

Antes de realizar qualquer ajuste, coloque as etiquetas da alíquota apropriadas (fornecidas com o "kit") em tubos de amostra de forma que os códigos de

barras possam ser lidos pelo dispositivo de leitura do aparelho.

Componentes do kit fornecidos separadamente

Diluyente de amostra para Homocisteína (L2HOZ)

Para diluição de amostras no aparelho. 25 mL de concentrado pronto a usar, de matriz proteica tamponizada, sem homocisteína. Estabilidade: 30 dias (após abertura) a 2–8°C ou 6 meses (em alíquotas) a –20°C.

Etiquetas de código de barras são fornecidas para usar com o diluyente. Antes de usar, colocar a etiqueta apropriada num tubo de teste (16 × 100 mm) de modo a que o código de barras possa ser lido pelo dispositivo de leitura do aparelho.

L2HOZ: 3 etiquetas

L2SUBM: Substrato quimioluminescente

L2PWSM: Solução de lavagem

L2KPM: Kit de limpeza do pipetador

LRXT: Tubos de reacção (descartáveis)

L2ZT: 250 Tubos de diluyente da amostra (16 x 100 mm)

L2ZC: 250 Tampas para tubos de diluyente da amostra

CCCM: Um módulo de controlo de Marcador Cardíaco baseado em soro não humano de dois níveis contendo homocisteína como um dos quatro diferentes constituintes.

Também necessário
Água destilada ou desionizada, tubos de teste, controlos.

Procedimento de doseamento

Têr em atenção que para obter um desempenho óptimo, é importante efectuar todos os procedimentos de manutenção de rotina conforme definido no Manual de Operador do IMMULITE 2000.

Ver o manual do operador do Sistema IMMULITE 2000 para instruções sobre preparação, ajuste, doseamento e procedimentos de controlo de qualidade.

Intervalo entre ajustes aconselhável:
4 semanas.

Amostras de controlo de qualidade:
utilize controlos ou "pools" com, pelo

menos, dois níveis (alto e baixo) de homocisteína.

Valores de Referência

Os níveis de Homocisteína podem variar com a idade, género, área geográfica e factores genéticos, assim é importante para o laboratório estabelecer os seus próprios valores de referência baseados nas populações locais. A literatura sugere uma gama de valores de referência de 5 – 15 µmol/L para homens e mulheres adultos,¹¹ mas também se nota que os homens tendem a ter valores mais altos que as mulheres e que as mulheres posmenopausicas tendem a ter valores mais altos que as premonopausicas.¹²

Cento e vinte amostras de homens e mulheres adultos aparentemente saudáveis (idade 22–66) foram analisados usando a Homocisteína no IMMULITE 2000. As amostras foram colocadas em tubos com heparina e mantidos em gelo até à separação do plasma dos globulos vermelhos. O valor médio foi de 7,7 µmol/L, com uma gama de 95% de 5,0 – 12 µmol/L.

Estes valores devem ser considerados apenas como directrizes. Cada laboratório deve estabelecer os seus próprios valores.

Limitações

Doentes tratados com medicamentos envolvendo S-adenosil-metionina podem apresentar níveis fálidamente elevados de homocisteína.

Embora a análise de componentes semelhantes da carbamazepina, fenitoína, 6-azauridina e antropeterina, indique não haver reacções cruzadas, amostras obtidas de doentes tratados com estas drogas bem como metrotexato, oxido nitroso e outros anti-convulsantes, devem ser interpretados com precaução visto estas substâncias terem mostrado interferência em alguns ensaios de Homocisteína.

Os anticorpos heterófilicos no soro humano podem reagir com as imunoglobulinas presentes no ensaio, causando interferência com os imunoenaios in vitro. [Ver Boscato LM, Stuart MC. Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays. Clin Chem

1988:34:27-33.] Amostras de doentes expostas em rotina a produtos ou soros de animais podem demonstrar este tipo de interferência, potencial causador de resultados anómalos. Estes reagentes foram formulados para minimizar o risco de interferência, contudo podem ocorrer potenciais interações entre soros (raros) e componentes do teste. Para fins de diagnóstico, os resultados obtidos neste ensaio devem ser sempre analisados em combinação com o exame clínico, história de medicação do doente e outros achados que possam correlacionar.

Características do ensaio

Ver tabelas e gráficos para dados representativos da performance do doseamento. Os resultados são apresentados em $\mu\text{mol/L}$. (Notar que estes resultados foram gerados em amostras de plasma heparinizado.)

Calibração: 2 – 50 $\mu\text{mol/L}$.

Sensibilidade Analítica: 0,5 $\mu\text{mol/L}$

Precisão: As amostras foram ensaiadas em quadruplicado no durante vários dias, num total de 20 séries e 80 réplicas. (Ver a tabela "Precision".)

Linearidade: As amostras foram doseadas sob vários níveis de diluição. (Ver a tabela de "Linearity" para dados representativos.)

Recuperação: Às amostras foram adicionadas na relação de 1 para 19 três soluções (125, 250 and 500 $\mu\text{mol/L}$) antes do doseamento. (Ver tabela de "Recovery" para dados representativos.)

Especificidade: O doseamento é específico para a homocisteína (Ver tabela de "Specificity".)

Bilirrubina: A presença de bilirrubina conjugada e não-conjugada em concentrações até 200 mg/L não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Hemólise: A presença de hemoglobina em concentrações até 512 mg/dL não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Lipemia: A presença de triglicéridos em concentrações até 3 000 mg/dL não tem efeito nos resultados, dentro da precisão do ensaio.

Tipo de Amostra Alternativa: Para avaliar se também o soro pode ser no IMMULITE 2000 Homocysteine, foi colhido sangue de 34 voluntários em tubos em gelo com heparina, EDTA e sem anticoagulante. As amostras foram separadas dos glóbulos e adicionadas com homocisteína e ensaiadas com os resultados seguintes:

(EDTA) = 0,98 (Heparina) + 0,85 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0,954$

(Soro) = 1,02 (Heparina) – 0,53 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0,975$

Médias:
20,2 $\mu\text{mol/L}$ (Heparina)
20,7 $\mu\text{mol/L}$ (EDTA)
20,1 $\mu\text{mol/L}$ (Soro)

Para avaliar o efeito da temperatura de conservação foram colhidas amostras de 5 voluntários em tubos com heparina, EDTA e sem anticoagulante. Alguns tubos foram conservados à temperatura ambiente, e outros foram conservados em gelo por vários períodos de tempo *antes da separação*. Os gráficos mostram o efeito do tempo e temperatura de conservação para heparina, EDTA e soro (Ver gráficos 1-3).

Método de Comparação 1: O ensaio foi comparado com um imunoensaio enzimático disponível comercialmente (Kit A) em 168 amostras de plasma (Gama de concentração: aproximadamente 4 a 43 $\mu\text{mol/L}$. Ver gráfico "Method Comparison 1".) Regressão linear:

(IML 2000) = 1,0 (Kit A) + 0,24 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0,966$

Médias:
12,9 $\mu\text{mol/L}$ (IMMULITE 2000)
12,7 $\mu\text{mol/L}$ (Kit A)

Método de Comparação 2: O ensaio foi também comparado com um método de HPLC usado num laboratório de referência nos Estados Unidos em 95 amostras de plasma heparinizado (Gama de concentração: aproximadamente 4 a 44 $\mu\text{mol/L}$. Ver gráfico "Method Comparison 2".) Regressão linear:

(IML 2000) = 0,97 (HPLC) + 0,71 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0,974$

Médias:
13,4 $\mu\text{mol/L}$ (IMMULITE 2000)
13,2 $\mu\text{mol/L}$ (HPLC)

Método de Comparação 3: O ensaio foi comparado com outro imunoensaio

disponível comercialmente (Kit B) em 113 amostras de plasma (Gama de concentração: aproximadamente 4 a 23 µmol/L. Ver gráfico "Method Comparison 3".) Regressão linear:

$(\text{IML 2000}) = 0,90 (\text{Kit B}) - 0,02 \mu\text{mol/L}$
 $r = 0,925$

Médias:

8,7 µmol/L (IMMULITE 2000)
9,6 µmol/L (Kit B)

Assistência Técnica:

Por favor contacte o seu Distribuidor Nacional.

O Sistema de Qualidade da Diagnostic Products Corporation está registado sob ISO 13485:2003.

DPC®

Diagnostic Products Corporation
Corporate Offices
5210 Pacific Concourse Drive
Los Angeles, CA 90045-6900
USA

2005-12-22

PIL2KHO – 11



EC REP DPC Biermann GmbH
61231 Bad Nauheim
Germany
+49 -6032-994-00