

IMMULITE[®]

Homocysteine

For use on the IMMULITE[®]
and IMMULITE[®] 1000 systems

DPC[®]

IMMULITE®/IMMULITE® 1000 Homocysteine

English

Intended Use: For *in vitro* diagnostic use with the IMMULITE and IMMULITE 1000 Analyzers — 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: **LKHO1** (100 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.

IMMULITE/IMMULITE 1000

Homocysteine involves a preliminary manual sample pretreatment step. Homocysteine in the patient plasma or serum sample is released from its binding proteins and converted to S-adenosyl-homocysteine (SAH) by an off-line 30-minute incubation at 37°C in the presence of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase and dithiothreitol (DTT).

The treated sample and alkaline phosphatase-labeled anti-SAH antibody are simultaneously introduced into a test unit containing an SAH-coated polystyrene bead. During a 30-minute incubation, the converted SAH from the patient sample competes with the immobilized SAH for binding the alkaline phosphatase labeled-anti-SAH antibody conjugate. 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 Cycle: 1 × 30 minutes.

Specimen Collection

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.

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.

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/IMMULITE 1000 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 – untreated sample:
15 µL untreated plasma or serum.

Volume Required – treated sample:
75 µL treated sample. (Sample cup must contain at least 100 µL more than the total volume required.)

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. The barcode labels are needed for the assay.

Homocysteine Test Units (LHO1)

Each barcode-labeled unit contains one bead coated with S-adenosyl-L-homocysteine (SAH). Stable at 2–8°C until expiration date.

LKHO1: 100 units.

Allow the Test Unit bags to come to room temperature before opening. Open by cutting along the top edge, leaving the ziplock ridge intact. Reseal the bags to protect from moisture.

Homocysteine Reagent Wedge (LHO2)

With barcode. 7.5 mL alkaline phosphatase (bovine calf intestine) conjugated to murine monoclonal anti-SAH in buffer. Store capped and refrigerated: stable at 2–8°C until expiration date. Recommended usage is within 30 days after opening when stored as indicated.

LKHO1: 1 wedge.

Pretreatment A Solution (LHOA)

20 mL bovine S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in buffer, with preservative. Stable at 2–8°C until expiration date.

Recommended usage is within 30 days after opening when stored as indicated.

LKHO1: 1 vial.

Pretreatment B Solution (LHOB)

2 mL dithiothreitol (DTT) in buffer. Stable at 2–8°C until expiration date.

Recommended usage is within 30 days after opening when stored as indicated.

LKHO1: 1 vial.

Pretreatment B Solution must be diluted 1-in-10 with distilled or deionized water before combining it with Pretreatment A

Solution. See section on Preparation of Sample Pretreatment Working Solution.

Homocysteine Adjustors (LHOL, LHOH)

Two amber vials (Low and High), 2 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.

LKHO1: 1 set.

Kit Components Supplied Separately

Homocysteine Sample Diluent (LHOZ)

For the manual dilution of patient samples. 25 mL of homocysteine-free protein/buffer matrix. Stable at 2–8°C for 30 days after opening, or for 6 months (aliquotted) at –20°C.

LSUBX: Chemiluminescent Substrate

LPWS2: Probe Wash Module

LKPM : Probe Cleaning Kit

LCHx-y: Sample Cup Holders (barcoded)

LSCP: Sample Cups (disposable)

LSCC: Sample Cup Caps (optional)

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

Also Required

Sample transfer pipets, distilled or deionized water, controls;

Variable micropipets: 10–500 µL.

Preparation of Sample Pretreatment Working Solution

1. Dilute sufficient volume of Pretreatment B Solution 1-in-10 with distilled or deionized water before combining it with Pretreatment A Solution in Step 2.
2. Combine equal volumes of Pretreatment A Solution and diluted Pretreatment B Solution in sufficient quantities for the number of samples to be processed.

For example, see chart below:

No. of Samples	Wkg Sol req. mL	H ₂ O mL	Pre-B µL	Pre-A mL	Total mL
5	1.5	0.90	100	1	2
10	3	1.8	200	2	4
15	4.5	2.25	250	2.5	5
20	6.0	3.15	350	3.5	7
25	7.5	3.6	400	4	8

Use Sample Pretreatment Working Solution within two hours of preparation.

Sample Pretreatment

Adjustors, Controls and patient samples must go through the Sample Pretreatment Procedure prior to analysis.

For Controls and Patient Samples

1. Label one test tube for each sample to be processed.
2. Add 300 µL of Sample Pretreatment Working Solution into the tubes prepared.
3. Add 15 µL of patient untreated plasma or serum to each tube.
4. Cover the tubes and mix well.
5. Incubate for 30 minutes at 37°C in a water bath or oven.
6. Transfer all of the treated sample into an IMMULITE Sample Cup.

For Adjustors

Because Adjustors are processed in replicates of 4, additional volume is required.

At Step 2, use 400 µL of Sample Pretreatment Working Solution.

At Step 3, use 20 µL of each of the Adjustor levels. Proceed with remaining pretreatment steps.

Treated samples, both serum and plasma, are stable at room temperature (15–28°C) or refrigerated at 2–8°C for 1 hour prior to assay.

Assay Procedure

Note that for optimal performance, it is important to perform all routine maintenance procedures as defined in the

IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual.

See the IMMULITE or IMMULITE 1000 Operator's Manual for: preparation, setup, dilutions, adjustment, assay and quality control procedures.

Visually inspect each Test Unit for the presence of a bead before loading it onto the system.

Recommended Adjustment Interval:
4 weeks.

Quality Control Samples: Use controls or sample 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 $\mu\text{mol/L}$ 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

Based on its relationship to IMMULITE 2000 Homocysteine procedure (see Method Comparison), the assay can be expected to have essentially the same reference ranges.

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 $\mu\text{mol/L}$, with a central 95% range of

5.0 – 12 $\mu\text{mol/L}$.

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 $\mu\text{mol/L}$. (Unless otherwise noted, all were generated on heparinized plasma samples.)

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

Analytical Sensitivity: 0.5 $\mu\text{mol/L}$

Precision: Samples were 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 (105, 207 and 411 $\mu\text{mol/L}$) 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 Homocysteine procedure, blood was collected on ice from 20 laboratory volunteers into plain, heparinized and EDTA vacutainer tubes. Samples were separated from the cells, and matched samples were spiked with homocysteine and then assayed by the IMMULITE Homocysteine procedure, with the following results.

(EDTA) = 1.08 (Heparin) – 1.10 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0.983$

(Serum) = 1.11 (Heparin) – 1.79 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0.992$

Means:

9.18 $\mu\text{mol/L}$ (Heparin)
8.82 $\mu\text{mol/L}$ (EDTA)
8.38 $\mu\text{mol/L}$ (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: The assay was compared to DPC's IMMULITE 2000 Homocysteine on 257 plasma samples (Concentration range: approximately 4 to 50 $\mu\text{mol/L}$, as measured by IMMULITE 2000. See graph.) By linear regression:

(IML) = 0.97 (IML 2000) + 0.86 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0.975$

Means:

13.5 $\mu\text{mol/L}$ (IMMULITE)
13.1 $\mu\text{mol/L}$ (IMMULITE 2000)

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	Within-Run		Total	
		SD	CV	SD	CV
1	11.05	1.01	9.1%	1.09	9.9%
2	19.06	1.37	7.2%	1.82	9.5%
3	25.33	1.79	7.1%	1.93	7.6%
4	27.49	1.85	6.7%	3.00	10.9%
5	35.99	2.25	6.3%	3.48	9.7%

Specificity

Compound ¹	µmol/L Added ²	% Cross reactivity ³
Adenosine	5,000	ND
S-adenosyl-L-methionine	500	0.6%
Cystathionine	500	5.7%
L-Cysteine	100,000	ND
Gluthathione	100,000	ND

ND: Not detectable.⁴

Linearity (µmol/L)

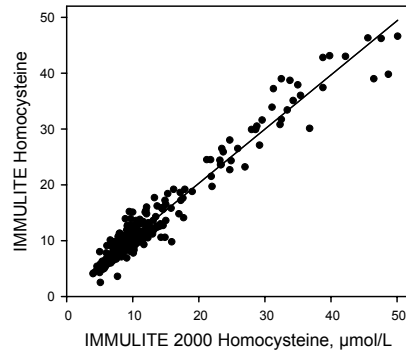
	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	8 in 8	7.28	—	—
	4 in 8	3.92	3.64	108%
	2 in 8	1.63	1.82	90%
	1 in 8	0.73	0.91	80%
2	8 in 8	8.68	—	—
	4 in 8	4.13	4.34	95%
	2 in 8	1.87	2.17	86%
	1 in 8	0.94	1.09	86%
3	8 in 8	28.33	—	—
	4 in 8	12.68	14.17	89%
	2 in 8	7.03	7.08	99%
	1 in 8	2.81	3.54	79%
4	8 in 8	32.39	—	—
	4 in 8	16.88	16.20	104%
	2 in 8	8.17	8.10	101%
	1 in 8	3.94	4.05	97%

	Dilution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
5	8 in 8	36.91	—	—
	4 in 8	17.50	18.46	95%
	2 in 8	8.62	9.23	93%
	1 in 8	4.18	4.61	91%

Recovery (µmol/L)

	Solution ¹	Observed ²	Expected ³	%O/E ⁴
1	—	6.09	—	—
	A	12.65	11.04	115%
	B	17.39	16.14	108%
	C	30.02	26.34	114%
2	—	9.38	—	—
	A	15.75	14.16	111%
	B	20.88	19.26	108%
	C	32.87	29.46	112%
3	—	20.88	—	—
	A	26.89	25.09	107%
	B	30.09	30.19	100%
	C	40.77	40.39	101%
4	—	30.25	—	—
	A	31.51	33.99	93%
	B	40.02	39.09	102%
	C	49.77	44.29	101%
5	—	34.60	—	—
	A	38.32	38.12	101%
	B	42.65	43.22	99%
	C	57.27	53.42	107%

Method Comparison

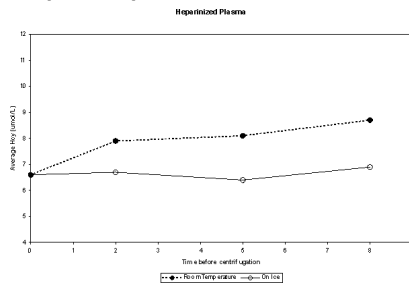


$$(IML) = 0.97 (IML 2000) + 0.86 \mu\text{mol/L}$$

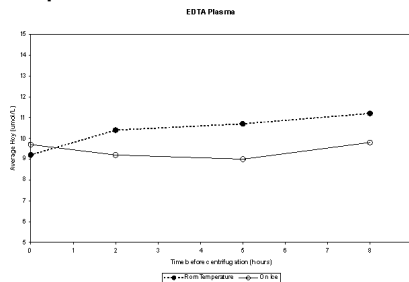
$$r = 0.975$$

Effect of Storage Temperature on Different Sample Types¹

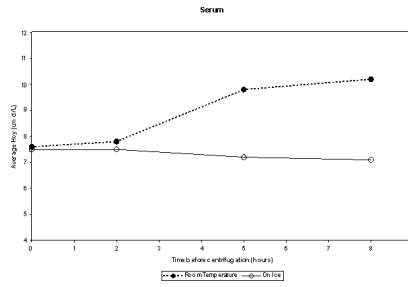
Graph 1: Heparin²



Graph 2: EDTA³



Graph 3: Serum⁴



Deutsch. Precision: ¹Intra-Assay, ²Gesamt, ³Mittelwert, ⁴S (Standardabweichung), ⁵CV (Variationskoeffizient). **Linearity:** ¹Verdünnung, ²Beobachten (B), ³Erwarten (E), ⁴% B/E, ⁵8 in 8. **Recovery:** ¹Lösung, ²Beobachten (B), ³Erwarten (E), ⁴% B/E. **Specificity:** ¹Verbindung, ²zugewetzte Menge, ³% Kreuzreaktivität, ⁴NN: Nicht nachweisbar. **Method Comparison:** Homocysteine: Homocysteine. **Effect of Storage Temperature on Different Sample Types:** ¹Effect of Storage Temperature on Different Sample Types, ¹Graph 1: Heparin, ²Graph 2: EDTA, Graph 3: Serum.

Español. Precisión: ¹Intraensayo, ²Total, ³Media, ⁴DS, ⁵CV. **Linealidad:** ¹Dilución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 en 8. **Recuperación:** ¹Solución, ²Observado (O), ³Esperado (E), ⁴%O/E. **Especificidad:** ¹Compuesto, ²Cantidad añadida, ³% Reacción cruzada, ⁴ND: no detectable. **Método Comparativo:** Homocisteína: Homocisteína. **Efecto de la Temperatura de Conservación en diferentes tipos de muestras:** ¹Gráfico 1: Heparina², Gráfico 2: EDTA³, Gráfico 3: Suero⁴.

Français. Précision: ¹Intraessai, ²Total, ³Moyenne, ⁴SD, ⁵CV. **Linéarité:** ¹Dilution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A, ⁵8 dans 8. **Récupération:** ¹Solution, ²Observé (O), ³Attendu (A), ⁴%O/A. **Spécificité:** ¹Composé, ²ajouté, ³Réaction croisée %, ⁴ND: non détectable. **Comparaison de méthode:** Homocysteine: Homocystéine. **Effet de la Température de Conservation sur différents types d'échantillons:** ¹Graphique 1: Héparine, ²Graphique 2: EDTA, Graphique 3: Sérum.

Italiano. Precisione: ¹Intra-serie, ²Totale, ³Media, ⁴SD (Deviazione Standard), ⁵CV (Coefficiente di Variazione). **Linearità:** ¹Diluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A, ⁵8 in 8. **Recupero:** ¹Soluzione, ²Osservato (O), ³Atteso (A), ⁴%O/A. **Specificità:** ¹Composto, ²quantità aggiunta, ³Percentuale di Crossreattività, ⁴ND: non determinabile. **Comparazione del Metodo:** Omocisteina: Omocisteina. **Effetto della temperatura di**

conservazione, su diversi Tipi di Campioni:¹
Effetto della temperatura di conservazione, su
diversi Tipi di Campioni, ¹Grafico 1: Eparina,
²Grafico 2: EDTA, Grafico 3: Siero.

Português. Precisão: ¹Entre-ensaios, ²Total,
³Média, ⁴Desvio padrão, ⁵Coefficiente de
variação. **Linearidade:** ¹Diluição, ²Observado
(O), ³Esperado (E), ⁴%O/E, ⁵8 em 8.

Recuperação: ¹Solução, ²Observado (O),
³Esperado (E), ⁴%O/E. **Especificidade:**

¹Composto, ²Quantidade adicionada,
³Percentagem de reacção cruzada, ⁴ND: não
detectável. **Método de Comparação:**

Homocysteine: Homoisteina. **Effect of Storage
Temperature on Different Sample Types:**

¹Efeito da Temperatura de Armazenamento em
Diferentes Tipos de Amostras, ¹Gráfico 1:
Heparina, ²Gráfico 2: EDTA, Gráfico 3: Soro.

Deutsch

IMMULITE Homocystein

Anwendung: Zur *in vitro*-Diagnostik
unter Verwendung der IMMULITE und
IMMULITE 1000 Systeme – zur
quantitativen Bestimmung von
L-Homocystein im Plasma oder Serum.
Die Bestimmung des L-Homocysteins
kann bei der Diagnose und Behandlung
von Patienten mit Verdacht auf
Hyperhomocysteinämie oder
Homocysteinurie eingesetzt werden.

Artikelnummer: **LKHO1** (100 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, Stickstoffoxiden,
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 oder zur
Cystein-Synthese über den B-6
abhängigen Transsulfurationsweg
verwendet werden.^{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. Hierbei handelt es sich um
einen seltenen genetischen Defekt der
Enzyme des Homocystein-
Stoffwechsels.^{1,2,3} 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 Männer 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.

Der IMMULITE/IMMULITE 1000
Homocystein Assay beinhaltet eine
manuelle Ein-Schritt-Vorbehandlung der
Proben. Homocystein in der
Patientenprobe wird von den
Bindungsproteinen abgespalten und in

einer 30-minütigen Inkubation in der Anwesenheit von S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase und Dithithreitol (DTT) in S-Adenoysl-Homocystein (SAH) umgewandelt.

Die so behandelte Probe wird gleichzeitig mit einem mit alkalische Phosphatase markierten Anti-SAH-Antikörper in ein IMMULITE Testeinheit überführt, das eine mit SAH beschichtete Polystyrol-Kugel enthält. 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.

Inkubationszyklen: 1 × 30 Minuten.

Probengewinnung

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 zurückhaltend zu interpretieren.

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 besonders schwierig.

Die Zentrifugation der Serumproben vor dem völligen Abschluss der Gerinnung kann zu Fibringerinneln führen. Um fehlerhaften Analyseergebnissen infolge von Gerinneln vorzubeugen, ist sicherzustellen, dass die Gerinnung vor der Zentrifugation der Proben vollständig abgeschlossen ist. Insbesondere Proben von Patienten unter Antikoagulantien-

therapie 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/IMMULITE 1000 Homocystein sind nicht mit allen möglichen Röhrchenvariationen ausgetestet worden. Details der getesteten Röhrchenarten sind dem Kapitel "Alternative Probenarten" zu entnehmen.

Erforderliche Menge – unbehandelte

Probe: 15 µl unbehandeltes Plasma oder Serum.

Erforderliche Menge – vorbehandelte

Probe: 75 µl vorbehandelte Probe. (Der Inhalt der Probenträger muss mindestens 100 µl über der erforderlichen Gesamtmenge liegen.)

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

Hinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Zur *In-vitro*-Diagnostik.

Reagenzien: Bei 2–8°C lagern. Unter Einhaltung der geltenden gesetzlichen Vorschriften entsorgen.

Die generell geltenden Vorsichtsmaßnahmen sind einzuhalten und alle Komponenten als potenziell infektiös zu behandeln. Alle aus menschlichem Blut gewonnenen Materialien wurden auf Syphilis, Antikörper gegen HIV-1 und HIV-2, Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Hepatitis-C-Antikörper untersucht und negativ befundet.

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

Chemilumineszenz-Substrat:

Kontamination und direkte Sonneneinstrahlung vermeiden. Siehe Packungsbeilage.

Wasser: Destilliertes oder deionisiertes Wasser verwenden.

Im Lieferumfang enthalten

Die Komponenten sind aufeinander abgestimmt. Die Barcode-Etiketten werden für den Assay benötigt.

Homocystein Testeinheiten (LHO1)

Jede mit Barcode-Etikette versehene Einheit enthält eine Polystyrol-Kugel beschichtet mit S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH). Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar.

LKHO1: 100 Testeinheiten.

Verpackte Testeinheiten vor dem Öffnen stehen lassen, bis sie Zimmertemperatur erreicht haben. Oben entlang der Kante aufschneiden, ohne den Plastikverschluss zu beschädigen. Verpackungen wieder dicht verschließen, damit der Inhalt trocken bleibt.

Homocystein -Reagenzbehälter (LHO2)

Mit Barcode. 7,5 ml alkalische Phosphatase konjugiert mit monoklonalem Anti-SAH-Antikörper (Maus) in Puffer. Verschlossen und gekühlt aufbewahren: Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Bei entsprechender Lagerung beträgt die empfohlene Verbrauchsfrist nach dem Öffnen 30 Tage.

LKHO1: 1 Behälter.

Vorbehandlungslösung A (LHOA)

20 ml S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase im Puffer, mit Konservierungsmittel. Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Bei entsprechender Lagerung beträgt die empfohlene Verbrauchsfrist nach dem Öffnen 30 Tage.

LKHO1: 1 Container.

Vorbehandlungslösung B (LHOB)

2 ml Dithiothreitol-Lösung (DTT) im Puffer. Bei 2–8°C bis zum Ablaufdatum haltbar. Bei entsprechender Lagerung beträgt die empfohlene Verbrauchsfrist nach dem Öffnen 30 Tage.

LKHO1: 1 Container.

Die Vorbehandlungslösung B muss 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden, bevor sie mit der Vorbehandlungslösung A vermischt wird. Siehe auch unter Vorbereitung der Vorbehandlungs-Arbeitslösung.

Homocystein- Kalibratoren (LHOL, LHOH)

Zwei braune Fläschchen (niedrig und hoch), je 2 ml, mit 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).

LKHO1: 1 Set.

Separat erhältliche Testsystem-Komponenten

Homocystein Verdünnungspuffer (LHOZ)

Zum manuellen Verdünnen der Patientenproben. Es enthält 25 ml einer Homocystein-freien-Protein-Puffermatrix. 30 Tage nach dem Öffnen bei 2–8°C haltbar oder 6 Monate bei –20°C (aliquotiert).

LSUBX: Chemilumineszenz-Substrat

LPWS2: Waschmodul

LKPM : Reinigungsmodul

LCHx-y: Probenträger (barcodiert)

LSCP: Probenröhrchen (Einwegartikel)

LSCC: Deckel für Probenröhrchen (optional)

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

Ebenfalls benötigt

Transferringpipetten für die Proben; destilliertes bzw. deionisiertes Wasser; Kontrollen und variable Micropipetten (10–500 µl).

Vorbereitung der Vorbehandlungs-Arbeitslösung

1. Eine ausreichende Menge an Vorbehandlungslösung B 1:10 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnen bevor sie im Schritt 2 mit der Vorbehandlungslösung A gemischt wird.
2. Gleiche Volumina der Vorbehandlungslösung A und Vorbehandlungslösung B mischen, so dass die erzielte Menge an Vorbehandlungs-Arbeitslösung für alle Proben ausreicht.

Als Beispiel kann nach der folgenden Tabelle verfahren werden:

Anzahl der Proben	Arbeitslösung (ml)	Dest. Wasser (ml)	Lösung B (µl)	Lösung A (ml)	Gesamtvolumen (ml)
5	1,5	0,90	100	1	2
10	3	1,8	200	2	4
15	4,5	2,25	250	2,5	5
20	6,0	3,15	350	3,5	7
25	7,5	3,6	400	4	8

Die Vorbehandlungs-Arbeitslösung sollte innerhalb von 2 Stunden nach Zubereitung aufgebraucht werden.

Probenvorbereitung

Kalibration, Kontrollen und Patientenprobe müssen vor der Bestimmung die gleiche Vorbehandlungsprozedur erfahren.

Kontrollen und Patientenproben

1. Für jede zu bearbeitende Probe ein Röhrchen beschriften.
2. 300 µl der Vorbehandlungslösung in die vorbereitenden Röhrchen pipettieren.
3. 15 µl der unbehandelten Patientenprobe in jedes Röhrchen pipettieren.
4. Die Röhrchen abdecken und gut durchmischen.
5. Für 30 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad oder Wärmeschrank inkubieren.
6. Überführen der behandelten Proben in ein IMMULITE-Probenröhrchen.

Kalibratoren

Da die Kalibratoren in Vierfach-Bestimmung eingesetzt werden, muss zusätzliches Volumen der Vorbehandlungs-Arbeitslösung einkalkuliert werden.

Beim 2. Schritt 400 µl der Vorbehandlungs-Arbeitslösung verwenden.

Beim 3. Schritt 20 µl der verschiedenen Kalibratoren einsetzen. Die restlichen Schritte wie oben beschrieben durchführen.

Vorbehandelte Proben (Serum oder Plasma) sind bei Raumtemperatur (15–28°C) oder im Kühlschrank (2–8°C) für eine Stunde bis Assaybeginn stabil.

Testdurchführung

Für eine optimale Funktion des Gerätes ist unbedingt zu beachten, dass die Wartungen, wie im IMMULITE oder IMMULITE 1000-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 oder IMMULITE 1000 - Handbuch.

Überprüfen Sie jede Testeinheit auf das Vorhandensein der Polystyrol-Kugel vor dem Einsetzen in das Gerät.

Empfohlenes Kalibrationsintervall:
4 Wochen.

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

Referenzwerte

Die Homocystein-Spiegel werden durch Alter, Geschlecht, geographische Region und genetische Faktoren beeinflusst. Daher ist es wichtig für Laboratorien, eigene auf den lokalen Gegebenheiten basierende Referenzbereiche zu ermitteln. In der Literatur wird ein Referenzbereich von 5-15 µmol/l für erwachsene Männer und Frauen beschrieben. Es muss berücksichtigt werden, dass bei Männern tendenziell höhere Werte gefunden werden als bei Frauen.¹¹ Hinzu kommt, dass postmenopausale Frauen höhere Werte zeigen als prämenopausale Frauen.¹²

Basierend auf der guten Korrelation des IMMULITE Assays zum IMMULITE 2000 Assay (siehe Methodenvergleich) können im wesentlichen die gleichen Referenzbereiche erwartet werden.

In einer Studie des Herstellers wurde Homocystein in 120 Proben von nachweislich gesunden weiblichen und männlichen 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 µmol/l und ein 95% Vertrauensbereich von 5,0 – 12 µmol/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 Humanseren können mit Immunglobulinen aus den Assaykomponenten reagieren und Interferenzen 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

Siehe Tabellen und Grafiken mit *repräsentativen* Daten für den Assay. Die Ergebnisse sind als $\mu\text{mol/l}$ ausgedrückt. (Alle wurden – sofern nicht anders angegeben – aus heparinisiertem Plasmaproben gewonnen.)

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 Homocystein-Lösungen (105, 207 und 411 $\mu\text{mol/l}$) 1:19 versetzt. (Repräsentative Daten entnehmen Sie bitte der Tabelle „Recovery“.)

Spezifität: Hochspezifischer Anti-Homocystein-Antikörper (siehe Tabelle „Specificity“).

Bilirubin: Konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin hat in Konzentrationen bis zu 200 mg/l keinen Einfluss auf die Ergebnisse, 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 hat in Konzentrationen bis zu 3 000 mg/dl keinen Einfluss auf die Ergebnisse, der größer als die Impräzision des Assays selbst ist.

Alternative Probenarten: Die Untersuchungen zum Einsatz verschiedener Probenmaterialien wurde folgendermaßen durchgeführt: Von 20 Probanden wurde Blut in Heparin-, EDTA- und Serumröhrchen entnommen. Die Proben wurden zentrifugiert, mit Homocystein versetzt und mit dem IMMULITE Homocystein analysiert. Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:

(EDTA) = 1,08 (Heparin) – 1,10 $\mu\text{mol/l}$
 $r = 0,983$

(Serum) = 1,11 (Heparin) – 1,79 $\mu\text{mol/l}$
 $r = 0,992$

Mittelwerte:
9,18 $\mu\text{mol/l}$ (Heparin)
8,82 $\mu\text{mol/l}$ (EDTA)
8,38 $\mu\text{mol/l}$ (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 Grafiken 1–3).

Methodenvergleich: der Assay wurde anhand von 257 Plasmaproben mit dem IMMULITE 2000 Homocystein-Assay von DPC verglichen (Konzentrationsbereich ca. 4 to 50 µmol/l, gemäß der Bestimmung auf dem IMMULITE 2000. Siehe Grafik.) Durch lineare Regression:

$$(IML) = 0,97 (IML\ 2000) + 0,86\ \mu\text{mol/l}$$
$$r = 0,975$$

Mittelwerte:
13,5 µmol/l (IMMULITE)
13,1 µmol/l (IMMULITE 2000)

Anwenderberatung

Bei Rückfragen wenden Sie sich bitte an Ihre DPC Niederlassung.

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

Español

IMMULITE Homocisteina

Utilidad del análisis: Para su uso en el diagnóstico *in vitro* con los analizadores IMMULITE e IMMULITE 1000 — para la determinación cuantitativa de la L-homocisteina humana en plasma o suero. Este kit no está pensado para el diagnóstico y tratamiento de los pacientes que tengan hiperhomocistinemia u homocistinuria.

Número de Catálogo: **LKHO1** (100 tests)

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

Precaución: las muestras de pacientes sometidos a terapias farmacológicas con S-adenosil-metionina pueden mostrar niveles falsamente elevados de homocisteína.

Aunque los análisis con compuestos relacionados con la carbamazepina, fenitoína, 6-azauridina, y antopterina indican que no existen reacciones cruzadas, las muestras de pacientes tratados con estos medicamentos, así como con metotrexate, óxido nitroso y otros anticonvulsivos, deben ser interpretadas con precaución ya que se ha observado que esas sustancias interfieren en determinados ensayos de homocisteína.

Resumen y Explicación del test

La homocisteína total (tHcy) ha surgido como un importante factor predictivo para evaluar la enfermedad cardiovascular.^{3-7,12}

La homocisteína es un aminoácido que contiene un grupo tiol, producto de la desmetilación intracelular de la metionina. Por tanto, la homocisteína sirve como pool que más tarde puede ser utilizado en la regeneración tanto de la metionina, a través de la acción de la enzima metionina sintasa folato dependiente, como de la cisteína, utilizando la vía de transulfuración B6 dependiente.^{1,2} La homocisteína se localiza en plasma principalmente unida a proteínas, pero también pueden estar presentes la formas libre, oxidada o disulfuro.

Se encuentran niveles elevados de homocisteína total en pacientes con homocistinuria, una rara enfermedad genética que afecta a los enzimas implicados en el metabolismo de la homocisteína.^{1,2,3} Los pacientes con homocistinuria presentan tromboembolismo arterial, retardo mental y arteroesclerosis temprana.¹ Defectos genéticos menos graves también están asociados con niveles moderadamente elevados de homocisteína.^{3,4,5}

La homocisteína ha sido identificada como marcador de enfermedad cardiovascular. Un meta análisis de 27 estudios epidemiológicos ha sugerido 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 análisis

Inmunoensayo competitivo

IMMULITE/IMMULITE 1000 Homocisteína requiere un pretratamiento manual preliminar de la muestra. La homocisteína presente en el plasma o suero del paciente es liberada de sus proteínas de unión y convertida en S-adenosil-homocisteína (SAH) durante una incubación de 30 minutos a 37°C en presencia de la S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa y ditiotriol (DTT).

La muestra tratada y anticuerpos anti-SAH marcados con fosfatasa alcalina son introducidos simultáneamente en la unidad de reacción que contiene una bola de poliestireno recubierta con SAH. Durante 30 minutos de incubación, la SAH obtenida a partir de la muestra pretratada del paciente compete 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 sustrato 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: 1 × 30 minutos.

Recogida de la muestra

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.

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.

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/IMMULITE 1000 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 Alternativas.

Volúmen Requerido – muestra no tratada: 15 µl de plasma o suero no tratado.

Volúmen Requerido – muestra tratada: 75 µl de muestra tratada. (La copa de muestra debería contener al menos 100 µl más que el volumen total de muestra requerido.)

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.

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

Agua: Use agua destilada o desionizada.

Materiales Suministrados

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

Unidades de análisis de Homocisteína (LHO1)

Cada unidad etiquetada con código de barras contiene una bola recubierta de S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad
LKHO1: 100 unidades

Espera a que las bolsas de las unidades de análisis alcancen la temperatura ambiente antes de abrirlas. Ábralas cortando por el extremo superior, dejando el borde del cierre de cremallera intacto. Vuelva a cerrar las bolsas herméticamente para protegerlas de la humedad.

Vial de Reactivo de Homocisteína (LHO2)

Con códigos de barras. 7,5 ml de fosfatasa alcalina (de intestino de ternera) conjugada con anticuerpos monoclonales de ratón anti-SAH en solución tampón. Guardar tapado y refrigerado: estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de abrirlo cuando se guarda según lo indicado.
LKHO1: 1 vial.

Solución de Pretratamiento A (LHOA)

20 ml de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa bovina en solución tampón, con conservante. Estable a 2–8°C hasta la fecha de caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de abrirlo cuando se guarda según lo indicado.
LKHO1: 1 vial.

Solución de Pretratamiento B (LHOB)

2 ml de tiotritiol (DTT) en solución tampón. Estable a 2–8°C hasta la fecha de

caducidad. Se recomienda utilizarlo antes de que pasen 30 días después de abrirlo cuando se guarda según lo indicado.

LKHO1: 1 vial.

La Solución de Pretratamiento B debe diluirse 1:10 con agua destilada o desionizada antes de mezclarla con la Solución de Pretratamiento A. Ver sección de Preparación de la Solución de Trabajo para el Pretratamiento de la Muestra.

Ajustadores de Homocisteína (LHOL, LHOH)

Dos viales color ámbar (bajo y alto) que contienen 2 ml cada uno de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) sintética en una matriz de proteína/tampón. Estable a 2–8°C, hasta 30 días después de su apertura o durante 6 meses (aliquotados) a –20°C.

LKHO1: 1 juego.

Componentes del kit que se suministran por separado

Diluyente de muestra de Homocisteína (LHOZ)

Para la dilución manual de las muestras de los pacientes. 25 ml de una matriz de proteína/tampón libre de homocisteína. Estable a 2–8°C durante 30 días después de su apertura o durante 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LSUBX: Sustrato quimioluminiscente

LPWS2: Lavado de sonda

LKPM: Kit de limpieza de sonda

LCHx-y: Soportes de recipientes de muestras (con códigos de barras)

LSCP: Recipientes de muestras (desechables)

LSCC: Tapas para los recipientes de muestras (opcionales)

CCCM: Control de dos niveles. Módulo Control de Marcadores Cardíacos basado en suero no humano, que contiene homocisteína como uno de sus cuatro componentes.

También necesarios

Pipetas de transferencia de muestra, Agua destilada o desionizada, controles, micropipetas de 10–500 µl.

Preparación de la Solución de Trabajo para el Pretratamiento de la Muestra

1. Diluir 1:10 un volumen suficiente de la Solución de Pretratamiento B con agua destilada o desionizada antes de mezclarla con la Solución de Pretratamiento A en la Paso 2.
2. Mezclar volúmenes iguales de la Solución de Pretratamiento A y la Solución de Pretratamiento B diluida en suficiente cantidad para el número de muestras que van a ser procesadas.

Para un ejemplo, ver la siguiente tabla:

No. of Muestras	Wkg Sol req. ml	H ₂ O ml	Pre-B µl	Pre-A ml	Total ml
5	1,5	0,90	100	1	2
10	3	1,8	200	2	4
15	4,5	2,25	250	2,5	5
20	6,0	3,15	350	3,5	7
25	7,5	3,6	400	4	8

Usar la Solución de Trabajo para el Pretratamiento de la Muestra dentro de las dos horas siguientes a su preparación.

Pretratamiento de la Muestra

Ajustadores, Controles y muestras de pacientes deben sufrir el Procedimiento de Pretratamiento de la Muestra antes de su análisis.

Para Controles y Muestras de Pacientes

- 1 Marcar un tubo de reacción para cada muestra que va a ser procesada.
- 2 Añadir 300 µl de Solución de Trabajo para el Pretratamiento de la Muestra en los tubos que se han preparado.
- 3 Añadir 15 µl del plasma o suero del paciente no tratados a cada tubo.
- 4 Tapar los tubos y mezclar bien
- 5 Incubar durante 30 minutos a 37°C en un baño de agua u horno.
- 6 Transferir toda la muestra tratada a un recipiente de muestra de IMMULITE.

Para Ajustadores

Como los Ajustadores van a ser procesados por cuadruplicado, es necesario un volumen adicional.

En el Paso 2, usar 400 µl de la Solución de Trabajo para el Pretratamiento de la Muestra.

En el Paso 3, usar 20 µl de cada nivel de Ajustador. Continuar con el resto de pasos del pretratamiento.

Las muestra tratadas, tanto suero como plasma, son estables a temperatura ambiente (15–28°C) o refrigeradas a 2–8°C durante 1 hora antes del ensayo.

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 o IMMULITE 1000.

Consulte el Manual del operador de IMMULITE o IMMULITE 1000 para: la preparación, instalación, ajuste, ensayo y procedimientos de control de calidad.

Inspeccionar visualmente cada unidad de reacción para asegurarse de que hay una bola antes de introducirla en el Sistema.

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 µmol/l para adultos hombres y mujeres,¹¹ pero hay que tener en cuenta que los hombres tienden a mostrar niveles más altos que las mujeres, y las mujeres postmenopausicas más altos que las premenopausicas.¹²

Basándonos en su relación con el ensayo IMMULITE 2000 Homocisteína (Ver Método de Comparación), podemos

esperar que el ensayo IMMULITE Homocisteína tenga los mismos rangos de referencia.

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

Las muestras de pacientes sometidos a terapia farmacológica con 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. (Véase la tabla "Precision").

Linealidad: las muestras fueron analizadas con varias diluciones. (Véase la tabla "Linearity" para resultados representativos).

Recuperación: Se analizaron muestras sobrecargadas 1 en 19 con tres soluciones de homocisteína (105, 207 y 411 $\mu\text{mol/l}$). (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 tienen ningún efecto sobre los resultados en términos de precisión.

Tipo de muestra alternativa: Para determinar si el suero puede ser utilizado con el kit de homocisteína IMMULITE, la sangre fue recogida en hielo a partir de 20 voluntarios dentro tubos vacutainer heparinizados, con EDTA o vacíos. Se separó las células de las muestras, y fueron cargadas con homocisteína y ensayadas con el kit de Homocisteína IMMULITE, con los siguientes resultados.

(EDTA) = 1,08 (Heparina) – 1,10 µmol/l
r = 0,983

(Suero) = 1,11 (Heparina) – 1,79 µmol/l
r = 0,992

Medias:

9,18 µmol/l (Heparina)

8,82 µmol/l (EDTA)

8,38 µmol/l (Suero)

Para asegurar el efecto de la temperatura de conservación, los tubos vacutainer heparinizados, con 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 durante varios periodos de tiempo previamente a la separación. Los gráficos muestran el efecto del tiempo de conservación y la temperatura para heparina, EDTA y suero. (Ver gráficos 1–3).

Método Comparativo: el ensayo ha sido comparado con el método IMMULITE 2000 Homocisteína de DPC en 257 muestras de plasma. (Intervalo de concentración: aproximadamente 4 a 50 µmol/l, medido por el ensayo IMMULITE 2000. Véase el gráfico). Por regresión lineal:

(IML) = 0,97 (IML 2000) + 0,86 µmol/l
r = 0,975

Medias:

13,5 µmol/l (IMMULITE)

13,1 µmol/l (IMMULITE 2000)

Asistencia técnica

Póngase en contacto con el distribuidor nacional.

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

Français

IMMULITE Homocystéine

Domaine d'utilisation: Pour le dosage quantitatif de le L-Homocystéine dans le plasma ou le sérum. Ce test est réservé à un usage *in vitro* avec l'Analyseur IMMULITE et de IMMULITE 1000 et constitue une aide dans le diagnostic et le suivi des patients suspectés de souffrir d'hyperhomocysteinémie ou d'homocystinurie.

Référence catalogue: **LKHO1** (100 tests)

Code produit : **HCY**

Code Couleur: **gris foncé**

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

Bien que l'analyse des composés parents de la carbamazépine, de la phénytoïne, de la 6-azauridine et de l'anthoptérine n'indique aucune réaction croisée, les échantillons obtenus de patients traités avec l'un de ces médicaments ou avec du méthotrexate, de l'oxyde nitreux ou tout autre anticonvulsif doivent être interprétés avec précaution, ces substances ayant déjà montré des interférences avec certains dosages de l'homocystéine.

Introduction

L'homocystéine totale (tHcy) a émergé comme facteur de risque important dans l'évaluation des maladies cardiovasculaires. 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 libres, 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 associée à un facteur de risque de maladie coronarienne artérielle (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

Le test IMMULITE/IMMULITE 1000 Homocystéine inclut une étape préliminaire manuelle de prétraitement des échantillons. L'Homocystéine des échantillons plasmatiques ou sériques de patients est séparée des protéines de liaison et convertie en S adénosyl homocystéine (SAH) après une incubation de 30 minutes à 37°C en dehors du système et en présence de S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase et de dithiothreitol (DTT).

L'échantillon prétraité et l'anticorps anti SAH marqué à la phosphatase alcaline sont introduits simultanément dans l'unité test qui contient une bille de polystyrène recouverte de SAH. Pendant une incubation de 30 minutes, le SAH 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 séparé par centrifugation. Le substrat est ajouté et la procédure continue comme décrite pour les immunodosages classiques dans le Manuel d'Utilisation.

Cycles d'incubation : 1 × 30 minutes.

Recueil des échantillons

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.

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.

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/IMMULITE 1000 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-avant prétraitement
15 µl de plasma ou de sérum non traité.

Volume nécessaire- échantillon prétraité : 75 µl d'échantillon prétraité. (L'unité-échantillon doit contenir au moins 100 µl de plus que le volume total nécessaire.)

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 les contaminations et l'exposition directe à la lumière solaire (voir la fiche technique).

Eau : utiliser uniquement 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.

Tests unitaires Homocystéine (LHO1)

Chaque unité à code-barre contient une bille revêtue de S-adenosyl-L-homocystéine (SAH). Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption.

LKHO1: 100 unités

Cartouche à réactif Homocystéine (LHO2)

Avec code-barre. 7,5 ml d'anticorps monoclonal murin anti-SAH marqué à la phosphatase alcaline (intestins de veau) dans un tampon. Conserver fermé et réfrigéré : stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption. Il est recommandé d'utiliser le réactif dans les 30 jours après ouverture.

LKHO1: 1 cartouche.

Solution A de prétraitement (LHOA)

20 ml de S-adenosyl-L-homocystéine hydrolase bovine dans un tampon avec conservateur. Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption. Il est recommandé d'utiliser le réactif dans les 30 jours après ouverture.

LKHO1: 1 flacon.

Solution B de prétraitement (LHOB)

2 ml de dithiothreitol (DTT) dans un tampon. Stable à +2°C/+8°C jusqu'à la date de péremption. Il est recommandé d'utiliser le réactif dans les 30 jours après ouverture.

LKHO1: 1 flacon.

La solution de prétraitement B doit être diluée au 1/10 dans de l'eau distillée ou désionisée avant d'être ajoutée à la solution de prétraitement A. Se reporter au chapitre de préparation de la solution de travail de prétraitement.

Ajusteurs Homocystéine (LHOL, LHOH)

Deux flacons de verre fumé ("Haut" et "Bas"), 2 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.

LKHO1: 1 jeu.

Composants du coffret fournis séparément

Diluant échantillon homocystéine (LHOZ)

Pour la dilution manuelle des échantillons cliniques. 25 ml de matrice tampon/protéines, exempte d'homocystéine. Conservation : 30 jours après ouverture à +2°C/+8°C ou 6 mois (aliquoté) à -20°C.

LSUBX: Substrat chimiluminescent

LPWS2: Solution de lavage

LKPM : Coffret de décontamination de l'aiguille de prélèvement

LCHx-y: Supports pour unités échantillons (avec code-barres)

LSCP: Unités échantillons (à usage unique)

LSCC: Bouchons pour unités échantillons (Option)

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

Egalement requis

Pipettes pour le transfert des échantillons ; eau distillée ou désionisée ; contrôles ; micropipettes à volume variable : 10–500 µl.

Préparation de la Solution de travail de prétraitement des échantillons

- 1 Diluer un volume suffisant de Solution B de prétraitement au 1/10 dans l'eau distillée ou désionisée avant de l'ajouter à la Solution A de prétraitement (voir 2^{ème} étape).
- 2 Mélanger à volume égal les solutions de prétraitement A et B (diluée). En préparer des quantités suffisantes pour le nombre de tests à réaliser.

Par exemple, se reporter au tableau ci-dessous:

Nb. d'éch	Sol. travail ml	H ₂ O ml	Pre-B µl	Pre-A ml	Total ml
5	1,5	0,90	100	1	2
10	3	1,8	200	2	4
15	4,5	2,25	250	2,5	5
20	6,0	3,15	350	3,5	7
25	7,5	3,6	400	4	8

Utiliser la solution de prétraitement des échantillons dans les 2 heures suivant la préparation.

Prétraitement des échantillons

Ajusteurs, contrôles et échantillons de patients doivent être prétraités avant dosage.

Pour les contrôles et échantillons de patients

- 1 Etiqueter chaque tube de verre dans lequel les échantillons doivent être prétraités.
- 2 Ajouter 300 µl de solution de travail de prétraitement des échantillons dans les tubes préparés.
- 3 Ajouter 15 µl de plasma ou de sérum non prétraité dans chaque tube.
- 4 Couvrir les tubes et bien mélanger.
- 5 Incuber 30 minutes à +37°C dans un bain-marie ou une étuve.
- 6 Transférer tous les échantillons traités dans des unités échantillons IMMULITE.

Pour les ajusteurs

Les ajusteurs étant prétraités en quadruplets, un volume supplémentaire est nécessaire.

A l'étape 2, utiliser 400 µl de solution de prétraitement des échantillons.

A l'étape 3, utiliser 20 µl de chacun des ajusteurs. Continuer avec les étapes suivantes.

Les échantillons prétraités, sérum et plasma, sont stables à température ambiante (+15°C/+28°C) ou réfrigérés à +2°C/+8°C 1 heure avant dosage.

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 ou de l'IMMULITE 1000.

Se reporter au manuel d'utilisation de l'IMMULITE ou de l'IMMULITE 1000 pour : la préparation, le démarrage du système, les ajustements, le dosage et les procédures de contrôle de qualité.

Vérifier visuellement que chaque Unité-Test contient bien une bille avant de la charger dans l'automate.

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

En raison de sa corrélation avec l'IMMULITE 2000 Homocystéine (voir comparaison de méthode), le test doit avoir les mêmes valeurs de référence.

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 de la 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 et induire 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 complétés par 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).

Intervalle de linéarité : 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 (105, 207 et 411 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 ne présente aucun effet sur les résultats ni sur la précision du dosage si la concentration ne dépasse pas 3 000 mg/dl.

Autres types d'échantillons: Pour s'assurer que le sérum puisse être utilisé avec le dosage IMMULITE Homocystéine, du sang a été prélevé auprès de 20 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
Homocystéine avec les résultats suivants :

(EDTA) = 1,08 (Héparine) – 1,10 µmol/l
r = 0,983

(Sérum) = 1,11 (Héparine) – 1,79 µmol/l
r = 0,992

Moyennes:
9,18 µmol/l (Héparine)
8,82 µmol/l (EDTA)
8,38 µmol/l (Sérum)

Pour évaluer l'effet de la température de conservation, des tubes vacutainer héparinés, 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 : Le dosage a été comparé au test IMMULITE 2000 Homocystéine de DPC sur 257 échantillons plasmatiques (dont les concentrations IMMULITE 2000 allaient d'environ 4 à 50 µmol/l. Voir graphique.)
Par régression linéaire:

(IML) = 0,97 (IML 2000) + 0,86 µmol/l
r = 0,975

Moyennes:
13,5 µmol/l (IMMULITE)
13,1 µmol/l (IMMULITE 2000)

Assistance technique

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: Per prove diagnostiche in vitro con gli Analizzatori IMMULITE ed IMMULITE 1000 — per la determinazione quantitativa della L-Omocisteina nel plasma o siero umano. Questo dispositivo costituisce un ausilio nella diagnosi e nel trattamento di pazienti con sospetta iperomocisteinemia o omocistinuria.

Codice: **LKHO1** (100 test)

Codice del Test: **HCY**

Colore: **Grigio Scuro**

Attenzione: Campioni provenienti da pazienti sottoposti a terapia con S-adenosil-metionina possono presentare livelli di Omocisteina falsamente elevati.

Benchè l'analisi dei composti originari della carbamazepina, fenitoina, 6-azauridina e antopterina non presentino crossreattività, i risultati di campioni ottenuti da pazienti trattati con questi farmaci cosiccome con il metotrexato, l'ossido di nitro ed altri anticonvulsivi devono essere interpretati con prudenza poiché queste sostanze hanno presentato interferenze con alcuni dosaggi dell'omocisteina.

Riassunto e Spiegazione del Test

L'Omocisteina totale (tHcy) si è rivelata un importante fattore di rischio nella determinazione delle malattie cardiovascolari.^{3-7,12} L'Hcy, un aminoacido che contiene tiolo è prodotta dalla demetilazione intracellulare della metionina. L'Hcy, quindi, serve come pool che può in seguito essere decontaminata ed utilizzata nella produzione sia della metionina attraverso l'azione della sintasi della metionina un enzima folato dipendente che della cisteina utilizzando il percorso di transulfurazione B6-dipendente.^{1,2} L'Hcy nel plasma viene riscontrata principalmente in forma legata alle proteine anche se sono egualmente presenti forme libere, ossidate e disolfate.

Livelli elevati di tHcy vengono riscontrati in pazienti affetti da omocistinuria, una malattia genetica rara degli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'Hcy.^{1,2,3} Pazienti affetti da omocistinuria presentano tromboembolia arteriosa, ritardo mentale e arteriosclerosi precoce.¹ Difetti genetici più lievi sono anche associati a 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 aumento di 5 µmol/l della

tHcy può essere associato ad una percentuale anomala nelle malattie cardiache (coronariche – CAD) di 1,6 per gli uomini e di 1,8 per le donne, lo stesso aumento nel rischio come aumento dello 0,5 mmol/L nel colesterolo.⁷ Inoltre, pazienti con malattie renali croniche complicate da malattie arteriosclerotiche cardiovascolari presentano livelli elevati di tHcy dovuti all'incapacità dei reni di rimuovere l'Hcy presente nel sangue.^{1,2,3}

Principio del procedimento

Immunodosaggio Competitivo.

Il dosaggio IMMULITE/IMMULITE 1000 Omocisteina comporta uno step preliminare di pretrattamento manuale del campione. L'Omocisteina presente nel plasma o nel siero del paziente viene rilasciata dalle sue proteine leganti e convertita in S-adenosil-Omocisteina (SAH) attraverso un'incubazione di 30 minuti a 37°C in presenza di idrolasi di S-adenosil-L-omocisteina e di ditiotreitolo (DTT).

Il campione trattato e l'anticorpo SAH marcato con fosfatasi alcalina vengono introdotti simultaneamente in una test unit contenente una sferetta di polistirene coattata con SAH. Durante un'incubazione di 30 minuti, l'SAH convertito proveniente dal campione del paziente compete con l'SAH immobilizzato per legare il coniugato anticorpale anti-SAH marcato con fosfatasi alcalina. Il coniugato enzimatico non legato viene rimosso attraverso centrifugazione. Viene aggiunto il substrato e la procedura continua come descritto per i comuni immunodosaggi nel Manuale dell'Operatore.

Incubazione: 1 × 30 minuti

Raccolta del Campione

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

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

Sono preferibili campioni di plasma eparinizzato ed EDTA, ma si può anche utilizzare il siero. È importante separare il plasma o il siero dalla cellula prima possibile dopo il prelievo poiché 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 in ghiaccio rende l'utilizzo di campioni di siero particolarmente difficile.

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 [IMMULITE 1000] 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 – campione non trattato: 15 µL di plasma o siero non trattato.

Volume Richiesto – campione trattato: 75 µL di campione trattato. (Il porta campioni deve contenere almeno 100 µL in più del volume totale richiesto.)

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

Avvertenze e Precauzioni

Ad uso diagnostico *in vitro*.

Reagenti: Conservare a 2–8°C. Eliminare secondo quanto previsto dalle leggi vigenti.

Seguire le precauzioni generali e manipolare tutti i componenti come se fossero potenzialmente infetti. I materiali derivati dal sangue umano sono stati testati con esito negativo per la Sifilide, gli Anticorpi anti-HIV 1 e 2, l'Antigene di Superficie dell'Epatite B e gli Anticorpi Anti-Epatite C.

È 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 sono un gruppo accoppiato. Le etichette del codice a barra sono necessarie per la prova.

Test Unit Omocisteina (LHO1)

Ogni unit. con codice a barra contiene una biglie coattata con S-adenosil-L-omocisteina (SAH). Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza.

LKHO1: 100 unit.

Le buste delle test unit devono essere a temperatura ambientale prima di aprire. Aprire tagliando lungo il bordo superiore, lasciando intatto la chiusura ermetica. Risigillare le buste per proteggere contro umidità.

Porta Reagente Omocisteina (LHO2)

Con codice a barre. 7,5 mL di fosfatasi alcalina (intestino bovino) coniugata con un anticorpo monoclonale murino anti-SAH in un tampone. Conservare chiuso e refrigerato: stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Se ne consiglia l'utilizzo entro 30 giorni dall'apertura se conservato secondo le indicazioni.

LKHO1: 1 porta reagente.

Soluzione di pretrattamento A (LHOA)

20 mL di S-adenosi-L-omocisteina idrolasi bovina in un tampone, con conservanti. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Se ne consiglia l'utilizzo entro 30 giorni dall'apertura se conservato secondo le indicazioni.

LKHO1: 1 fialone.

Soluzione di pretrattamento B (LHOB)

2 mL di ditiotreitolo (DTT) in un tampone. Stabile a 2–8°C fino alla data di scadenza. Se ne consiglia l'utilizzo entro 30 giorni dall'apertura se conservato secondo le indicazioni.

LKHO1: 1 fialone.

La Soluzione di Pretrattamento B deve essere diluita 1:10 con acqua distillata o deionizzata prima di mescolarla con la Soluzione di Pretrattamento A. Vedi la sezione sulla Preparazione del Campione e sulla Soluzione di Lavoro per il Pretrattamento.

Calibratori Omocisteina (LHOL, LHOH)

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

LKHO1: 1 set.

Componenti del Kit Forniti Separatamente

Diluente del Campione Omocisteina (LHOZ)

Per la diluizione manuale dei campioni dei pazienti. 25 mL di una matrice/tampone proteica priva di omocisteina. Stabile a 2–8°C per 30 giorni dopo l'apertura o per 6 mesi (aliquotato) a –20°C.

LSUBX: Substrato Chemiluminescente

LPWS2: Tampone di lavaggio dell'Ago

LKPM : Kit di Pulizia dell'Ago

LCHx-y: Tubi Porta Campioni (con codice a barre)

LSCP: Porta campioni (monouso)

LSCC: Coperchi per Porta Campioni (opzionali)

CCCM: Un controllo bi-livello basato su siero non umano per Marcatori Cardiaci, contenente Omocisteina quale uno dei quattro costituenti.

Materiali Richiesti,

Pipette per la dispensazione dei campioni; acqua distillata o deionizzata, controlli; micropipette da 10–500 µL.

Preparazione della Soluzione di Lavoro per il Pretrattamento del Campione

1. Diluire 1:10 un volume sufficiente di Soluzione di Pretrattamento B con acqua distillata o deionizzata prima di mescolarla con la Soluzione A per il Pretrattamento al punto 2.
2. Mescolare un equal volume di Soluzione di Pretrattamento A con la Soluzione di Pretrattamento B diluita

in quantità sufficienti per il numero di campioni da processare.

Ad esempio, vedi tabella sottostante:

Num. Camp.	Soluzione Lavoro richiesta. mL	H ₂ O mL	Pre-B µL	Pre-A mL	Totale mL
5	1,5	0,90	100	1	2
10	3	1,8	200	2	4
15	4,5	2,25	250	2,5	5
20	6,0	3,15	350	3,5	7
25	7,5	3,6	400	4	8

Utilizzare la Soluzione di Lavoro di Pretrattamento entro due ore dalla preparazione.

Pretrattamento del Campione

Calibratori, controlli e campioni dei pazienti devono essere sottoposti alla Procedura di Pretrattamento del Campione prima dell'analisi.

Per i Controlli ed i Campioni dei Pazienti

1. Etichettare una provetta per ogni campione da processare.
2. Aggiungere 300 µL di Soluzione di Lavoro per il Pretrattamento del Campione nelle provette preparate.
3. Aggiungere 15 µL di siero o plasma non trattato ad ogni provetta.
4. Coprire le provette e mescolare bene.
5. Incubare per 30 minuti at 37°C in un bagnetto termostato o forno.
6. Trasferire tutti i campioni trattati in un Porta Campioni IMMULITE.

Per i Calibratori

Poiché i Calibratori sono processati in replicati di 4, viene richiesto un volume aggiuntivo.

Al Punto 2, utilizzare 400 µL di Soluzione di Lavoro per il Pretrattamento del Campione.

Al Punto 3, utilizzare 20 µL di ciascuno dei livelli dei Calibratori. Procedere con le fasi successive del Pretrattamento.

I campioni trattati, sia siero che plasma sono stabili a temperatura ambiente (15–28°C) o refrigerati a 2–8°C per 1 ora prima del dosaggio.

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 o IMMULITE 1000.

Vedere il manuale dell'operatore IMMULITE o IMMULITE 1000 per: la preparazione, la messa a punto, la regolazione, la prova ed i procedimenti per il controllo della qualità.

Controllate ogni test unit verificando la presenza della sferetta prima di caricarla sullo strumento.

Intervallo di Calibrazione Consigliato:
4 settimane.

Campioni per il Controllo di Qualità:
Utilizzare controlli o pool di campioni con almeno due livelli (Basso ed Alto) 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 per i laboratori stabilire i propri valori di riferimento sulla base della popolazione locale. La letteratura suggerisce un range di riferimento di 5–15 µmol/L per gli adulti maschi e femmine,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 delle donne in premenopausa.¹²

Sulla base della sua relazione con il dosaggio Omocisteina IMMULITE 2000 (vedi Comparazione dei Metodi), ci si attende che il dosaggio abbia gli stessi range di riferimento.

Centoventi campioni appartenenti a pazienti adulti in apparente buono stato di salute, uomini e donne volontari di età compresa tra 22 e 66 anni sono stati testati utilizzando il kit Omocisteina IMMULITE 2000. I campioni sono stati prelevati in provette eparinizzate e mantenute in ghiaccio prima della separazione del plasma dalle cellule. Il

valore mediano era 7,7 µmol/L, con un range centrale 95%

5,0–12 µmol/L.

Considerare questi limiti solo come *linee guida*. Ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri range di riferimento.

Limiti

I campioni provenienti da pazienti sottoposti a terapia con 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

Vedere le tabelle e le grafiche per i dati *rappresentativi* delle prestazioni della prova. I risultati sono espressi in µmol/L. (Se non diversamente indicato, tutti i risultati sono stati generati a partire da campioni di plasma eparinizzato.)

Gamma di calibrazione: 2–50 µmol/L

Sensibilità Analitica: 0,5 µmol/L

Precisione: I campioni sono stati dosati in quadruplicato nel corso di diversi giorni, per un totale di 20 sedute ed 80 replicati. (Vedere la tabella "Precision")

Linearità: I campioni sono stati provati sotto varie diluzioni (Vedere la tabella "Linearity" per i dati rappresentativi).

Ricupero: Sono stati analizzati i campioni etichettati da 1 a 19 con tre soluzioni di omocisteina (105, 207 e 411 µmol/L). (Vedere la tabella "Recovery" per i dati rappresentativi).

Specificità: L'anticorpo è molto specifico per l'Omocisteina. (Vedere 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.

Campione Alternativo: Per determinare se sia possibile utilizzare il kit IMMULITE Omocisteina, è stato prelevato sangue in provette ghiacciate semplici, eparinizzate e vacutainer EDTA da 20 laboratori volontari. I campioni sono stati separati dalle cellule ed ai campioni mescolati tra di loro è stata aggiunta Omocisteina. Gli stessi sono stati dosati con il test Omocisteina IMMULITE ottenendo i seguenti risultati:

(EDTA) = 1,08 (Eparina) – 1,10 µmol/L
r = 0,983

(Siero) = 1,11 (Eparina) – 1,79 µmol/L
r = 0,992

Valore Medio:
9,18 µmol/L (Eparina)
8,82 µmol/L (EDTA)
8,38 µmol/L (Siero)

Per determinare l'effetto della temperatura di conservazione, sono stati prelevati campioni in provette eparinizzate, EDTA e vacutainer semplici da cinque volontari per ognuno dei tipi di provetta. Alcune provette sono state conservate a

temperatura ambiente, mentre altre provette sono state mantenute nel ghiaccio per periodi di tempo diversi *prima della separazione*. I grafici di seguito riportati presentano l'effetto dei tempi di conservazione e della temperatura per l'eparina, l'EDTA ed il siero (Vedi grafici 1-3).

Paragone dei metodi: La prova è stata paragonata al IMMULITE 2000 Omocisteina della DPC in 257 campioni di plasma (Gamma di concentrazione: da 4 a 50 µmol/L circa, come misurati dall'IMMULITE 2000. Vedere la grafica.) Mediante regressione lineare:

$$(IML) = 0,97 (IML\ 2000) + 0,86\ \mu\text{mol/L}$$
$$r = 0,975$$

Valore Medio:
13,5 µmol/L (IMMULITE)
13,1 µmol/L (IMMULITE 2000)

Assistenza Tecnica

Contattare il Distributore Nazionale.

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

Português

IMMULITE Homocysteine

Utilização: Para uso diagnóstico *in vitro* nos analisadores IMMULITE e IMMULITE 1000 – para o doseamento quantitativo da L-homocisteína em plasma ou soro humano. Este dispositivo pode ser útil no diagnóstico e tratamento de doentes suspeitos de terem hiperhomocisteinemia ou homocistinúria.

Número de Catálogo: **LKHO1** (100 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.

Apesar de análises feitas a compostos semelhantes de carbamazepina, penitoina 6-azauridina e antopterina indicarem a não existência de reações cruzadas, algumas amostras de doentes tratados com estas drogas e também com metotrexato, óxido nítrico e outros anticonvulsantes, devem ser interpretados com precaução pois são substâncias que têm mostrado interferir em alguns ensaios de 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 arterosclorose 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 mmol/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 arteriosclerótica apresentam Hcy total elevada devido à impossibilidade do rim para remover Hcy do sangue.^{1,2,3}

Princípio do Procedimento

Imunoensaio Competitivo.

O IMMULITE/IMMULITE 1000

Homocisteína envolve um pré-tratamento manual da amostra. A Homocisteína no soro ou plasma do doente liberta-se das suas proteínas de ligação e é convertida em S-adenosil-L-homocisteína (SAH) através de uma incubação de 30 minutos a 37°C na presença de S-adenosil-L-homocisteína hidrolase e ditriotreitól (DTT).

A amostra tratada e um anticorpo anti-SAH marcado com fosfatase alcalina são simultaneamente introduzidos numa unidade de teste contendo uma esfera de polistireno revestida com SAH. Durante a incubação de 30 minutos, a SAH obtida da amostra do doente compete com a SAH imobilizada para a ligação ao anti-SAH marcado com fosfatase alcalina. O conjuado enzimático não ligado é removido na lavagem. Adiciona-se o substrato e o procedimento continua como descrito no Manual do Operador do IMMULITE.

Ciclos de incubação: 1 × 30 minutos

Colheita

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.

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, 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.

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 / IMMULITE 1000 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- amostra não tratada: 15 µL de plasma ou soro.

Volume de amostra- amostra tratada: 75 µL de amostra tratada. (A cuvete de amostra deve conter um mínimo de 100 µL a mais que o volume total exigido.)

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 leis aplicáveis.

Manipule com as devidas precauções todos os materiais capazes de transmitir doenças infecciosas. As matérias primas obtidas de soro humano foram testadas, dando resultados negativos para a sífilis, para os anticorpos do vírus da imunodeficiência humana (HIV 1 e 2); para o antígeno 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 à luz directa (ver bula do substrato).

Água: Use água destilada ou deionizada.

Materiais fornecidos

Os componentes formam um conjunto uno e indivisível. Os códigos de barras no

interior das caixas são necessários para o ensaio.

Unidades de teste de Homocisteína(LHO1)

Cada unidade identificada com código de barras contém uma pérola revestidas com S-adenosil-L-homocisteína (SAH). Estável até a data de validade a 2–8°C.

LKHO1: 100 unidades.

Deixe que as saquetas de Unidade de Teste fiquem à temperatura ambiente antes de as abrir. Abra, cortando pela ranhura superior, mantendo o fecho intacto. Sele novamente as saquetas para proteger contra a humidade.

Embalagem de reagentes de Homocisteína (LHO2)

Com código de barras. 7,5 mL de fosfatase alcalina (de intestino bovino) conjugada com anti-SAH monoclonal de murino em tampão. Guarde tapado e refrigerado: Estável até à data de validade a 2–8°C. Recomenda-se a utilização até 30 dias após ser aberto quando armazenado de acordo com as indicações.

LKHO1: 1 embalagem.

Solução de Pretratamento A (LHOA)

20 mL de S-adenosil-L- homocisteína hidrolase bovina em tampão, com conservante. Estável até a data de validade a 2–8°C. Recomenda-se a utilização dentro de 30 dias após a abertura quando armazenado segundo as indicações.

LKHO1: 1 frasco.

Solução de Pretratamento B (LHOB)

2 mL de ditioneitol (DTT) em tampão. Estável até a data de validade a 2–8°C. Recomenda-se a utilização dentro de 30 dias após a abertura quando armazenado segundo as indicações.

LKHO1: 1 frasco.

A Solução de Pretratamento B deve ser diluída 1 para 10 com água destilada ou desionizada antes de combinar com a Solução de Pretratamento A. Ver a secção de Preparação da Solução de Trabalho de Pretratamento da Amostra.

Ajustes Homocisteína (LHOL, LHOH)

Dois frascos ambar (baixo e Alto), 2 mL cada, de um derivado sintético de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) numa matriz de base proteica. Estável durante 30 dias após a abertura a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LKHO1: 1 conjunto.

Componentes do kit fornecidos separadamente

Diluinte de amostra para Homocisteína (LHOZ)

Para a diluição manual de amostras de doentes. 25 mL, de matriz proteica tamponada, sem homocisteína. Estável durante 30 dias após a abertura a 2–8°C, ou por 6 meses (aliquotado) a –20°C.

LSUBX: Substrato quimioluminescente

LPWS2: Solução de lavagem

LKPM: Dispositivo de limpeza do pipetador

LCHx-y: Suportes das cuvetes de amostra (com código de barras)

LSCP: Cuvetes de amostra (descartáveis)

LSCC: Tampa de cuvetes de amostra (opcional)

CCCM: Módulo de Controlo de Marcadores Cardiacos de dois níveis constituído por soro não humano contendo homocisteína como um de quatro constituintes diferentes.

Também necessário:

Pipetas de transferência de amostra; água destilada ou desionizada, controlos.

Micropipetas reguláveis: 10 – 500 µL

Preparação da Solução de de Trabalho para o Pré-Tratamento da Amostra

1. Dilua o volume suficiente da Solução de Pré-Tratamento B 1 para 10 com água destilada ou desionizada ante de a combinar com a solução de Pré-Tratamento A no passo 2.
2. Combine eguais volumes da Solução de Pré-Tratamento A da Solução de Pré-Tratamento B diluída em quantidades suficientes para o número de amostras a serem processadas.

Por exemplo, ver tabela seguinte:

No. de Amostras	Sol Trab. Req mL	H ₂ O mL	Pre-B μ L	Pre-A mL	Total mL
5	1,5	0,90	100	1	2
10	3	1,8	200	2	4
15	4,5	2,25	250	2,5	5
20	6,0	3,15	350	3,5	7
25	7,5	3,6	400	4	8

Use Solução de Trabalho de Pré-Tratamento da Amostra dentro de duas horas.

Pré-Tratamento da Amostra

Ajustes, Controlos e doentes devem sofrer o Procedimento de Pré-Tratamento antes de serem analisadas.

Para controlos e Amostras de Doentes

1. Marque um tubo de teste para cada amostra a ser processada.
2. Adicione 300 μ L da Solução de Trabalho de Pré-Tratamento da Amostra em cada tubo.
3. Adicione 15 μ L da plasma ou soro de doentes não tratada em cada tubo.
4. Tape os tubos e misture bem.
5. Incubar durante 30 minutos a 37°C em banho maria.
6. Transfira toda a amostra tratada numa cuvete da amostra IMMULITE.

Para Ajustes

Porque os Ajustes são processados em 4 réplicas, é necessário volume adicional.

No passo 2, use 400 μ L da Solução de Trabalho de Pré-Tratamento da Amostra.

No passo 3, use 20 μ L de cada nível de Ajuste. Continue com os passos restantes de pré-tratamento.

Amostras tratadas, tanto soro como plasma, são estáveis à temperatura ambiente (15–28°C) ou refrigeradas a 2–8°C por 1 hora.

Procedimento do 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 ou IMMULITE 1000.

Consulte o Manual do Operador de IMMULITE ou IMMULITE 1000 para para instruções sobre preparação, ajuste, doseamento e procedimentos de controlo de qualidade.

Confirme a presença da esfera em cada Unidade de Teste antes de a colocar no sistema

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 μ mol/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 premenopausicas.¹²

Com base na relação entre este Dispositivo e o IMMULITE 2000 Homocysteine (Ver Comparação de Métodos) é de esperar que o ensaio tenha essencialmente os mesmos valores de referência.

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 μ mol/L, com uma gama de 95% de 5,0 – 12 μ mol/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 falsamente elevados de homocisteína.

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

Os anticorpos heterófilos 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-se

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 de homocisteína (105, 207 e 411 $\mu\text{mol/L}$) 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 triglicerídeos em concentrações até 3 000 mg/dL não tem efeito em resultados, dentro da precisão do ensaio.

Tipo de Amostra Alternativa: Para avaliar se também o soro pode ser usado no IMMULITE Homocysteine, foi colhido sangue de 20 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) = 1,08 (Heparina) – 1,10 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0,983$

(Soro) = 1,11 (Heparina) – 1,79 $\mu\text{mol/L}$
 $r = 0,992$

Médias:

9,18 $\mu\text{mol/L}$ (Heparina)

8,82 $\mu\text{mol/L}$ (EDTA)

8,38 $\mu\text{mol/L}$ (Serum)

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 o IMMULITE 2000 Homocysteine em 257 amostras de plasma (Gama de concentração: aproximadamente 4 a 50 $\mu\text{mol/L}$ quando

doseadas no IMMULITE 2000. Ver gráfico.) Por regressão linear:

$(IML) = 0,97 (IML\ 2000) + 0,86\ \mu\text{mol/L}$
 $r = 0,975$

Médias:

13,5 $\mu\text{mol/L}$ (IMMULITE)
13,1 $\mu\text{mol/L}$ (IMMULITE 2000)

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

PILKHO – 8



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