

**Aplicación**

Inmunoensayo automatizado para la determinación cuantitativa de L-homocisteína total en plasma humano citratado por turbidimetría de partículas de látex en los Sistemas de Coagulación de IL.

**NOTA:** Las muestras de pacientes que siguen una terapia de drogas relacionadas con la S-adenosil-metionina pueden mostrar niveles falsamente elevados de homocisteína. Los pacientes que están tomando metotrexano, carbamapocina, fenitoína, óxido nítrico, anticonvulsivos, o triacetato de 6-azauridina, pueden tener niveles elevados de homocisteína debido a su efecto en la vía metabólica. Refórtese a la sección Limitaciones/interferencias de este folleto.

**Principio**

La Homocisteína (Hcy) es un aminoácido sulfurado originado en la demetilación de la metionina. La Hcy circula en el plasma mayoritariamente en su forma oxidada ligada a proteínas plasmáticas (principalmente albúmina).<sup>1,2</sup> También se encuentran pequeñas cantidades de homocisteína reducida y de su dímero desulfurado (homocistina). La suma de todos los tipos de Hcy del plasma (libre y combinada a proteínas) representa la Hcy total (tHcy).

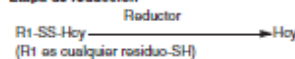
La Hcy puede ser metabolizada a cisteína o metionina por la acción de varios enzimas, cofactores o sustratos. Un incremento en el nivel de Hcy en sangre (hiperhomocisteinemia) puede ocurrir cuando dichas reacciones no están equilibradas.<sup>2</sup>

Concentraciones muy elevadas de Hcy se encuentran en pacientes con homocistinuria, una rara alteración genética que causa retraso mental, artroesclerosis precoz y tromboembolismo arterial y venoso.<sup>1,2</sup> Se conocen otros defectos genéticos menos severos que también producen niveles moderadamente elevados de Hcy.<sup>1</sup> La hiperhomocisteinemia, incluso moderada, es un factor de riesgo establecido de tromboembolismo arterial o venoso.<sup>4</sup> Niveles de Hcy elevados también pueden presentarse secundariamente debido a otras enfermedades como la anemia y/o asistolia,<sup>1,2</sup> y la enfermedad renal crónica.<sup>2</sup>

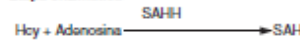
Los niveles de Hcy en el plasma de un paciente pueden medirse automáticamente en los Sistemas de Coagulación de IL en 3 etapas:

1. Reducción de la Hcy presente en el plasma, como mezcla de formas disulfuradas y ligada a proteínas, a Hcy libre.
2. Conversión enzimática de la Hcy libre a S-adenosil-L-homocisteína (SAH) por acción de la SAH hidrolasa (SAH-H) en presencia de un exceso de adenosina.
3. Reacción de aglutinación competitiva del látex anti-SAH, con el SAH y el conjugado.

**Etapas de reducción**



**Etapas enzimática**



**Etapas de aglutinación competitiva**



El grado de aglutinación es inversamente proporcional a la concentración de tHcy en la muestra y se determina midiendo el descenso de la luz transmitida causado por los agregados.

Los valores de homocisteína (Hcy) pueden ayudar en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes sospechosos de tener hiperhomocisteinemia o homocistinuria.

**Composición**

El kit de **Homocisteína** consiste en:

- B** **Buffer** (Núm. Cat. 0020007810): 2 viales x 9 mL de PBS (solución tampón fosfato) con conservante.
- Rd** **Reductant** (Núm. Cat. 0020007820): 2 viales x 2 mL de adenosina y solución de Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) en tampón fosfato con estabilizante y conservante.
- E** **Enzyme** (Núm. Cat. 0020007830): 2 viales x 2 mL de solución de S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa recombinante (SAH-H) en tampón fosfato con estabilizante y conservante.
- Cn** **Conjugate** (Núm. Cat. 0020007840): 2 viales x 2.5 mL de solución de conjugado en PBS (solución tampón fosfato) con estabilizante y conservante.
- Lr** **a-SAH Latex Reagent** (Núm. Cat. 0020007850): 2 viales x 2 mL de una suspensión liofilizada de partículas de látex de polivinilona sensibilizadas con un anticuerpo monoclonal anti-S-adenosil-L-homocisteína (SAH) en un tampón conteniendo albúmina de suero bovino y 0,02% de Bronidol<sup>TM</sup> como conservante.
- C** **Calibrator** (Núm. Cat. 0020007860): 2 viales x 1 mL de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) en PBS (solución tampón fosfato) con conservante.

**MEDIDAS DE PRECAUCIÓN Y ADVERTENCIAS:**

El tampón, conjugado y calibrator contienen azida sódica (< 0,1%), que puede reaccionar con las tuberías metálicas dando lugar a azidas altamente explosivas. Tomar las precauciones adecuadas para su desecho.

Indicaciones de Peligro: **Ninguna**

Frasas de Riesgo: **Ninguna**

Frasas de Seguridad: **Ninguna**

Este producto es para diagnóstico *in vitro*.

**Preparación**

**a-SAH Latex Reagent:** Disolver el contenido de un vial con 2 mL de agua tipo II (CLSI) (anteriormente NCLIS) o equivalente.<sup>2</sup> Tapar el vial y homogeneizar suavemente. Asegurarse de la completa disolución del producto. Mantener el reactivo entre 15-25°C durante 30 minutos. Mezclar suavemente por inversión del vial antes de su uso. No agitar.

**Calibrator y otros reactivos:** Mezclar suavemente por inversión del vial. El calibrator y resto de reactivos están listos para su uso.

Nota: Los reactivos no son intercambiables entre lotes.

**Conservación y estabilidad de los reactivos**

Los viales que no hayan sido abiertos y se hayan conservado a 2-8°C son estables hasta la fecha de caducidad indicada en el etiqueto.

**a-SAH Latex Reagent - Estabilidad una vez reconstituido:** 2 meses a 2-8°C en el vial original o 8 horas a 15°C en el vial destapado y colocado en los Sistemas de coagulación de IL. No congelar.

**Otros reactivos - Los reactivos abiertos son estables:** 2 meses a 2-8°C en el vial original o 8 horas a 15°C en el vial destapado y colocado en los Sistemas de Coagulación de IL. No congelar. Para una óptima estabilidad sacar los reactivos de los instrumentos y conservarlos a 2-8°C en sus viales originales bien tapados.

**Método de ensayo**

Para instrucciones completas del procedimiento del ensayo refórtese al Manual de Aplicaciones de IL del instrumento correspondiente.

**Recolección y preparación de las muestras**

Recoger nueva parte de sangre recién extraída por punción venosa sobre una parte de anticoagulante citrato trisódico.<sup>2</sup>

Nota: Después de la recolección de la sangre y antes de la separación del plasma se produce un aumento de la tHcy que depende del tiempo y temperatura de conservación y que puede prevenirse por centrifugación a 1000 x g durante 10 minutos y separación de los hematíes, antes de 1 hora, o colocando las muestras de sangre en un baño de hielo hasta su centrifugación (hasta 8 horas).

Después de la centrifugación de los glóbulos rojos la tHcy se estable en el plasma hasta 3 días a 2-8°C o 3 meses a -20°C. Las muestras pueden congelarse-descongelarse hasta 3 veces sin ningún efecto en los resultados del ensayo. Después de congelarse, las muestras deben mezclarse para asegurar su homogeneización.<sup>1</sup>

**Reactivos adicionales y plasmas de control**

Los siguientes reactivos y controles no se suministran con el kit y deben pedirse por separado. Controles de Homocisteína Núm. Cat. 0020007900

Cleaning solution (Solución de limpieza) Núm. Cat. 0009931700

**Control de calidad**

Para realizar un programa completo de control de calidad, se recomienda el uso de dos niveles de control. Los controles de homocisteína se han designado a este efecto.<sup>11</sup> Cada laboratorio debe establecer su propia media y desviación estándar, y debe realizar un programa de control de calidad para monitorizar sus resultados. Los controles deben ser analizados como mínimo una vez por cada turno de 8 horas de acuerdo con la normativa Buenas Prácticas del Laboratorio. Consultar la publicación de Westgard et al para la identificación y resolución de situaciones anormales del control de calidad.<sup>12</sup>

**Trazabilidad de los calibradores y controles**

El valor del calibrator de Hcy indicado en el folleto ha sido obtenido a través de múltiples determinaciones en los Sistemas de Coagulación de IL usando lotes específicos de reactivos y un Calibrador Estándar interno de Hcy.

Como no hay Estándar Internacional de homocisteína, el Calibrador Estándar interno ha sido preparado diluyendo en un tampón exclusivo una solución concentrada de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) en tampón fosfato.<sup>13,14</sup>

El calibrator de Hcy, cuando se utiliza para calibrar el ensayo de Hcy en los Sistemas de Coagulación de IL de acuerdo con las recomendaciones establecidas, demuestra conmutabilidad con los resultados de las muestras de los pacientes.

**Resultados**

Los resultados de Hcy se informan en µmol/L.

Consultar el Manual del Usuario para información adicional.

Los resultados del análisis deben ser usados conjuntamente con el resto de información, incluyendo el contacto clínico.

**Limitaciones/interferencias**

Las muestras de pacientes que han recibido preparados de anticuerpos monoclonales con líneas diagnósticas citotóxicas pueden contener anticuerpos anti-ratón (HAMAs). Los anticuerpos anti-ratón presentes en muestras de suero o plasma pueden interferir en los inmunoensayos que utilicen anticuerpos monoclonales de ratón.<sup>15,16</sup> Este tipo de muestras no deben emplearse en el ensayo de Hcy.

Concentraciones de hemoglobina hasta 400 mg/dL, de bilirrubina hasta 19 mg/dL, de triglicéridos hasta 1325 mg/dL, de factor reumatoide hasta 480 UI/ml y de fluoruro sódico no afectan a los resultados de Hcy en ninguno de los sistemas de coagulación de IL.

**Nota importante:** Las siguientes drogas: metotrexano, carbamapocina, fenitoína, óxido nítrico y triacetato de 6-azauridina pueden dar elevados niveles de Hcy.<sup>17</sup>

El mecanismo de acción afecta a diferentes partes de la vía metabólica de la Hcy.

**Especificidad analítica**

No se ha encontrado reacción cruzada con ninguno de los siguientes compuestos cuyas estructuras químicas o uso concurrente puede interferir en el ensayo de Hcy:

Compuesto	Concentración analizada	Reacción cruzada
S-adenosil-L-metionina	0,5 mmol/L	2,6%
L-cisteína	5,0 mmol/L	0,0%
Adenosina	1,0 mmol/L	0,2%
L-cistionina	2,0 mmol/L	0,1%
L-metionina	0,4 mmol/L	-0,2%
DL-homocisteína-isoleucina	0,1 mmol/L	4,7%
Glutamina	100 mmol/L	0,0%

**Valores esperados**

Se ha realizado un estudio del rango de normalidad utilizando el kit de Hcy.

Sistema	N	Hcy total
Muestras de 136 donantes aparentemente sanos de un banco de sangre en España fueron usadas para determinar los siguientes rangos de normalidad:		
ACL TOP Family	136	4,3 - 11,1 µmol/L
ACL ELITE/ELITE PRO/9/10000	136	4,0 - 11,2 µmol/L
ACL Futura/ACL Futura Avance	136	4,1 - 10,6 µmol/L
Un estudio adicional del rango de normalidad fue realizado en un lugar de Estados Unidos con 125 muestras de individuos aparentemente sanos:		
ACL TOP Family	125	3,5 - 9,3 µmol/L

Nota: La concentración de Hcy en el plasma de individuos sanos puede variar con la edad, sexo, área geográfica y factores genéticos. La literatura científica reporta que los hombres tienen niveles más elevados de Hcy que las mujeres, y que las mujeres post-menopausadas tienen niveles más elevados de Hcy que las pre-menopausadas. Durante el embarazo se observa una disminución considerable de los valores de Hcy. En países con programas de fortificación de ácido fólico se ha observado una reducción en los niveles de Hcy.<sup>1</sup>

Los valores de Hcy en plasma citrato son aproximadamente un 14,6% inferiores que los obtenidos en plasma EDTA o heparina debido a la dilución con el anticoagulante.<sup>18</sup> Los rangos han sido calculados como recomendados la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).<sup>19</sup>

Estos resultados se han obtenido utilizando un lote específico de reactivo. Debido a las muchas variables que pueden afectar a los resultados, cada laboratorio debe establecer su propio rango de normalidad.

**Características técnicas**

**Precisión:**

El estudio de precisión intraserie y total (serie a serie y día a día) fue realizado en diferentes series.<sup>20</sup>

ACL TOP Family	Media (µmol/L)	CV% (Intraserie)	CV% (Total)
Control Hcy nivel I	11,4	2,0	4,8
Control Hcy nivel II	22,4	1,5	3,5
Plasma Hcy	8,1	2,9	5,5

ACL ELITE/ELITE PRO/ 9/9/10000	Media (µmol/L)	CV% (Intraserie)	CV% (Total)
Control Hcy nivel I	12,3	2,3	5,1
Control Hcy nivel II	22,8	4,3	6,2
Plasma Hcy	8,4	2,6	5,9

ACL Advance	Media (µmol/L)	CV% (Intraserie)	CV% (Total)
Control Hcy nivel I	10,5	3,5	6,0
Control Hcy nivel II	21,1	2,6	3,5
Plasma Hcy	7,9	3,5	5,8

**Correlación:**

Sistema	Pendiente	Intersección	r	Método de referencia
ACL TOP Family	0,9780	0,2943	0,989	HemosIL Hcy en ACL 9000
ACL Futura/ ACL Advance	0,9459	0,0149	0,989	HemosIL Hcy en ACL 9000
ACL ELITE/ELITE PRO/9/9/10000	0,8292	0,3505	0,992	Hcy Polarización Fluorescencia (FPFA)*

\*Nota: Estudio realizado con pares de plasma citrato sódico (HemosIL Hcy) y plasma EDTA (método de comparación).

La precisión y los datos de correlación se han obtenido usando lotes específicos de reactivos y de controles.

**Límite de detección:**

**Sistema**  
Establecido por comprobación de 20 replicados del Buffer del kit en varios instrumentos/ plataformas utilizando 2 lotes distintos de reactivos. El valor más alto de los obtenidos (valor promedio ± 3SD) fue considerado el límite de detección: Sistemas de Coagulación de IL 2,4 µmol/L

**Sensibilidad funcional:**

Establecido por comprobación de diluciones del calibrator del kit y de una muestra baja de Hcy. Cada dilución se comprobó 5 veces en varios instrumentos/plataformas utilizando 2 lotes distintos de reactivos. El valor de Hcy más bajo de los reportados con un error y un CV inferior al 20% fue considerado la sensibilidad funcional.

Valor más bajo de Hcy con un error y un CV <20%: 4,5 µmol/L.

**Linealidad:**

Sistema	Test Regular	Test Runin
Sistemas de Coagulación de IL	4,5 - 30 µmol/L	9 - 60 µmol/L

El ensayo no presenta efecto de prozona hasta 600 µmol/L en ninguno de los Sistemas de Coagulación de IL.

Los instrumentos que tienen activada la capacidad "Auto-Ranun", realizan una dilución 1:2 automática de las muestras y corrigen el resultado final por el factor de dilución, expandiendo el rango del test hasta 60 µmol/L. Si el resultado obtenido todavía es superior al rango válido expandido, es decir las muestras se informan con resultados por encima de 60 µmol/L, estas deben diluirse manualmente 1:10 con el Hcy Buffer (50 µL de muestra + 450 µL de Hcy Buffer) y reanalizarse en el ensayo normal. Los resultados obtenidos deben multiplicarse por 10, para corregir el factor de dilución.

Nota: Valor del calibrator de Hcy. Refórtese a la última página, después de la Bibliografía, para el valor asignado.