

Utilização prevista

Imunoensaio em latex automatizado e melhorado para a determinação quantitativa da L-homocisteína total no plasma humano citratado nos sistemas de coagulação da IL.

NOTA: As amostras dos doentes que estão medicados com fármacos com S-adenosil-metionina podem apresentar níveis falsamente elevados de homocisteína. Os doentes que estão a tomar metotrexato, carbamazepina, fenitoína, óxido nítrico, anticonvulsivantes, ou 6-azuridina triacetato, podem ter níveis elevados de homocisteína devido ao seu efeito na via de actuação. Consulte a secção de Limitações/Substâncias interferentes neste folheto informativo.

Resumo e princípio

A homocisteína é um aminoácido sulfídrico (Hcy) derivado da desmetilação intracelular da metionina. A Hcy circula no plasma, maioritariamente na forma oxidada ligada a proteínas plasmáticas (principalmente albumina).^{1,2} Também estão presentes, quantidades menores de homocisteína reduzida e de dímeros dissulfídicos Hcy (homocistina). A adição de todas as espécies de Hcy encontradas no plasma (livre e ligada ao plasma) representam a Hcy total (tHcy).

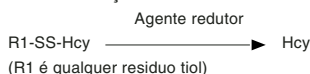
A Hcy pode ser metabolizada a cisteína ou a metionina, através da acção de várias enzimas, cofactores e substratos. Pode ocorrer um aumento do nível sanguíneo de Hcy (hiperhomocisteinemia) quando ocorrem problemas nestas reacções.²

Em indivíduos com homocistinúria, encontram-se níveis gravemente elevados de Hcy. Trata-se de uma doença genética rara que provoca atraso mental, arterioesclerose precoce e tromboembolismo venoso e arterial.^{1,3} Outros erros genéticos menos graves podem causar, níveis moderadamente elevados de Hcy.¹ A hiperhomocisteinemia, mesmo que moderada, é um factor de risco bem estabelecido para o tromboembolismo venoso/arterial.⁴ O aumento dos níveis de Hcy também podem surgir secundariamente a alguma doença, tal como anemia e/ou astenia^{5,6} e doença renal crónica.^{7,8}

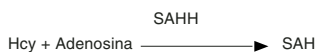
Os níveis de Hcy no plasma dos doentes são medidos automaticamente nos sistemas de coagulação da IL, em três fases:

1. Redução dos dissulfidos e formas de Hcy ligadas às proteínas misturadas, presentes nas amostras de plasma, a Hcy livre.
2. Conversão enzimática da Hcy livre a S-adenosil-L-homocisteína (SAH) pela hidrolase SAH (SAHH) na presença de adenosina em excesso.
3. Reacção de aglutinação competitiva entre anti-SAH e conjugado/SAH.

Passo de Redução



Passo Enzimático



Passo de aglutinação competitiva



O grau de aglutinação é inversamente proporcional à concentração de tHcy na amostra e é determinado pela medição do decréscimo da luz transmitida, causada pelos agregados.

Os valores de homocisteína (Hcy) podem apoiar no diagnóstico e tratamento de doentes com suspeita de hiperhomocisteinemia ou homocistinúria.

Composição

O kit **Hcy** consiste em:

- B** **Buffer** (Cat. No. 0020007810): 2 frascos x 9 mL de PBS (solução de tampão fosfato) com conservante.
- Rd** **Reductant** (Cat. No. 0020007820): 2 frascos x 2 mL de adenosina e solução Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP) em tampão Bis-Tris com conservante.
- E** **Enzyme** (Cat. No. 0020007830): 2 frascos x 2 mL de solução S-adenosil-L-homocisteína-hidrolase recombinante (SAHH) em tampão fosfato com estabilizante e conservante.
- Ch** **Conjugate** (Cat. No. 0020007840): 2 frascos x 2.5 mL de solução de conjugado em PBS (solução de tampão fosfato) com estabilizante e conservante.
- LR** **a-SAH Latex Reagent** (Cat. No. 0020007850): 2 frascos x 2 mL de uma suspensão liofilizada de partículas de latex de poliestireno revestidas com um anticorpo monoclonal anti S-adenosil-L-homocisteína (SAH) em tampão com albumina sérica bovina e Bronidox(tm)0.02% como conservante.
- C** **Calibrador** (Cat. No. 0020007860): 2 frascos x 1 mL de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) em PBS (solução de tampão fosfato) com conservante.

PRECAUÇÕES E AVISOS:

O Buffer, o Conjugate e o Calibrador contêm azida sódica em concentração inferior a 0.1%, que pode formar azidas explosivas em contacto com a canalização de metal. Utilize os procedimentos adequados de eliminação. Evitar o contacto com a pele e os olhos (S 24/25). Não deitar os resíduos no esgoto; não eliminar o produto e o seu recipiente sem tomar as precauções de segurança devidas (S 29/35). Usar vestuário de protecção, luvas e equipamento protector para os olhos/face adequados. (S 36/37/39). Este produto destina-se a uso em diagnóstico *in vitro*.

Preparação

a-SAH Latex Reagent: Dissolva o conteúdo de cada frasco em 2 mL de água CLSI tipo II (anteriormente NCCLS) ou equivalente.⁹ volte a colocar a tampa e rode suavemente. Assegure-se de que o produto foi completamente reconstituído. Mantenha o reagente entre 15-25°C durante 30 minutos e inverta-o cuidadosamente para misturar, antes de utilizar. Não agite com força.

Outros Reagentes e Calibrador: Inverta para misturar, antes de utilizar. Os reagentes/calibrador estão prontos a utilizar.

NOTA: Os reagentes não são intercambiáveis entre lotes.

Conservação e estabilidade dos reagentes

Os reagentes selados são estáveis até ao fim do prazo de validade impresso no frasco, desde que conservados entre 2-8°C.

a-SAH Latex Reagent - Estabilidade pós-reconstituição: 2 meses entre 2-8°C no frasco original, 8 horas a 15°C instalado nos Sistemas de coagulação da IL. Não congele.

Outros Reagentes - Os reagentes abertos são estáveis: 2 meses entre 2-8°C no frasco original, 8 horas a 15°C instalado nos Sistemas de coagulação da IL. Não congele.

Para optimização da estabilidade remove os reagentes do sistema e conserve-os entre 2-8°C no frasco original.

Procedimentos instrumento/teste

Consulte as aplicações adequadas do instrumento IL para conhecer os procedimentos completos do ensaio.

Colheita e preparação das amostras

Nove partes de sangue venoso recente são adicionados a uma parte de citrato trissódico.¹⁰

Nota: Após a colheita de sangue e antes da separação do plasma, há um aumento dependente do tempo e da temperatura na tHcy, que pode ser evitado, quer por centrifugação a 1000 x g durante 10 minutos no espaço de uma 1 hora e removendo o plasma das células ou mantendo as amostras de sangue em gelo até centrifugá-las (até 8 horas).

Após a remoção dos eritrócitos, a tHcy é estável no plasma durante pelo menos, 3 dias entre 2-8°C ou 3 meses a -20°C. As amostras podem ser congeladas-descongeladas até 3 vezes, sem qualquer efeito significativo sobre os resultados do ensaio. Após descongelar as amostras, deverá misturá-las para assegurar a homogeneidade.¹

Reagentes adicionais e plasmas de controlo

Os seguintes itens não são fornecidos com o kit e têm de ser adquiridos separadamente.

	Américas, Região do Pacífico e Europa
Homocysteine Controls	Cat. No. 0020007900
Cleaning solution	0009831700

Controlo de qualidade

São recomendados dois níveis de controlo para um programa completo de controlo de qualidade.¹¹ Os Homocysteine Controls foram concebidos para este programa. Cada laboratório deve estabelecer a sua média e o seu desvio padrão e deve também estabelecer um programa de controlo de qualidade para monitorizar as análises do laboratório. Os controlos devem ser analisados, pelo menos uma vez, em cada turno de 8 horas, de acordo com as boas práticas de laboratório. Consulte Westgard *et al* para identificação e resolução de situações fora do controlo.¹²

Rastreabilidade dos calibradores e materiais de controlo

O valor notificado do Hcy Calibrador foi determinado após várias análises nos Sistemas d e coagulação da IL utilizando lotes de reagentes específicos e contra um lote padrão de Hcy Calibrador interno.

Como actualmente não está disponível um Padrão internacional de Hcy, o lote padrão interno de Hcy Calibrador foi preparado pela diluição com um tampão dedicado, uma solução stock concentrada de S-adenosil-L-homocisteína (SAH) em tampão fosfato.^{13,14}

O Hcy Calibrador, quando é utilizado para calibrar o ensaio Hcy nos Sistemas de coagulação da IL, de acordo com as recomendações da IL, demonstra comutabilidade com as amostras dos doentes.

Resultados

Os resultados da Hcy são dados em µmol/L.

Consulte o Manual do Operador do instrumento para obter informação adicional.

Para formar um diagnóstico, os resultados do ensaio devem ser utilizados com outra informação, incluindo o contexto clínico.

Limitações/substâncias interferentes

As amostras de doentes que receberam preparações de anticorpo monoclonal de ratinho para diagnóstico ou terapêutica, podem conter anticorpos humanos anti-ratinho (HAMA). Os HAMA estão presentes nas amostras de plasma ou soro podem interferir nos imunoensaios que utilizam anticorpos monoclonais de ratinho.^{15,16} Estas amostras não devem ser analisadas com o ensaio Hcy.

Os resultados da Hcy nos sistemas de coagulação da IL não são afectados pela hemoglobina até 490 mg/dL, bilirrubina até 18 mg/dL, triglicéridos 1325 mg/dL, factor reumatóide até 480 IU/mL e fluoreto de sódio até 4.0 g/L.

Nota importante : os fármacos seguintes- metotrexato, carbamazepina, fenitoína, óxido nítrico e triacetato de 6-azauridina, podem causar níveis elevados de Hcy.¹⁷ o mecanismo de acção afecta partes diferentes da via metabólica da Hcy.

Especificidade analítica

Não foi encontrada reactividade cruzada com os compostos seguintes, cuja estrutura química ou uso simultâneo possa interferir com ensaio da Hcy:

Composto	concentração analisada	% de reactividade cruzada
S-Adenosil-L-metionina	0.5 mmol/L	2.4%
L-Cisteína	5 mmol/L	0.0%
Adenosina	1 mmol/L	0.2%
L-Cistationina	2 mmol/L	0.1%
L-Metionina	0.4 mmol/L	-0.2%
DL-Homocisteína-tiolactona	0.1 mmol/L	3.7%
Glutationa	100 mmol/L	0.0%

Valores esperados

Realizou-se um estudo de intervalo normal com o kit Homocysteine.

Sistema	N	tHcy
136 dados aparentemente saudáveis do banco de sangue espanhol foram utilizados para determinar os seguintes intervalos normais:		
ACL TOP	136	4.3 - 11.1 µmol/L
ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000	136	4.0 - 11.2 µmol/L
ACL Futura/ACL Advance	136	4.1 - 10.6 µmol/L

Foi realizado um estudo adicional de intervalo normal nos EUA utilizando 126 amostras de indivíduos aparentemente saudáveis:

ACL TOP	126	3.6 – 10.4 µmol/L
---------	-----	-------------------

Nota: A concentração de Hcy no plasma de indivíduos saudáveis pode variar com a idade, sexo, área geográfica e factores genéticos. A literatura científica atribui aos homens valores mais elevados do que nas mulheres, e as mulheres pós-menopáusicas têm valores de Hcy mais elevados do que, as pré-menopáusicas. Durante a gravidez, observa-se um decréscimo considerável dos valores de Hcy. Os valores de Hcy são consideravelmente menores. Em países com programas de suplementação com ácido fólico, podem observar-se níveis reduzidos de Hcy.¹

O plasma citratado tem resultados mais baixos, em cerca de 14,6%, em relação ao plasma heparinizado ou com EDTA, devido à diluição com o anticoagulante.¹⁸

Os intervalos foram calculados como recomendado pela International Federation of Clinical Chemistry (IFCC).¹⁹

Estes resultados foram obtidos utilizando um lote específico de reagente. Devido a muitas variáveis que podem afectar os resultados, cada laboratório deverá estabelecer o seu intervalo normal.

Características de desempenho

Precisão:

A precisão intra-análise e total (de análise para análise e de dia para dia) foi avaliada ao longo de múltiplas análises.²⁰

ACL TOP	Média (µmol/L)	CV% (intra-análise)	CV% (Total)
Hcy Control Level 1	11.4	2.0	4.8
Hcy Control Level 2	22.4	1.5	3.5
Amostra de plasma Hcy	8.1	2.9	5.5

ACL ELITE/ELITE PRO/8/9/10000	Média (µmol/L)	CV% (intra-análise)	CV% (Total)
Hcy Control Level 1	12.3	2.3	5.1
Hcy Control Level 2	22.8	4.3	6.2
Amostra de plasma Hcy	8.4	2.6	5.9

ACL Futura/ACL Advance	Média (µmol/L)	CV% (intra-análise)	CV% (Total)
Hcy Control Level 1	10.5	3.5	6.0
Hcy Control Level 2	21.1	2.6	3.5
Amostra de plasma Hcy	7.9	3.5	5.6

Correlação:

Sistema	Declive	Intercepção	r	Método comparativo
ACL TOP	0.9780	0.2943	0.989	HemosIL Hcy no ACL 9000
ACL Futura/	0.9459	0.0149	0.989	HemosIL Hcy no ACL 9000
ACL ELITE/ELITE PRO /8/9/10000	0.8292	0.3503	0.992	Fluorescência Hcy Imunoensaio de olarização*

*NOTA: Este estudo utilizou um emparelhamento de citrato de sódio (IL Hcy) versus EDTA (método comparativo) Amostras de plasma de doentes

A precisão e os resultados de correlação foram obtidos utilizando lotes específicos de reagentes e controlos.

Limite de detecção:

Sistema

Estabelecido pela análise de 20 replicados do kit Buffer em múltiplas plataformas de instrumentos utilizando 2 lotes de reagentes diferentes. O valor obtido mais elevado (média + 3DP) foi determinado como sendo o limite de detecção:

Sistemas de Coagulação da IL 2.4 µmol/L

Sensibilidade Funcional:

Estabelecido pela análise de diluições do kit de calibração e uma amostra Hcy baixa. Cada diluição foi analisada 5 vezes em múltiplas plataformas de instrumentos utilizando 2 lotes de reagentes diferentes. O valor de Hcy mais elevado notificado com inexactidão CV <20% foi determinado como a sensibilidade funcional:

O valor mensurável mais baixo de Hcy com inexactidão e CV < 20%: 4.5 µmol/L

Linearidade:

Sistema

Sistemas de Coagulação da IL 4.5 - 30 µmol/L

O ensaio não demonstra efeito de prózona até 600 µmol/L nos sistemas de coagulação da IL.

Os instrumentos com capacidade de "Auto Rerun" executam a diluição de 1:2 e a correcção automática dos resultados, alarga o intervalo do teste para 60 µmol/L. Se o resultado continuar a exceder o intervalo alargado, ou seja, amostras com resultados acima de 60 µmol/L, então a amostra deve ser diluída manualmente de 1:10 com Hcy Buffer (50 µL de amostra + 450 µL de Hcy Buffer) e reanalisada no ensaio padrão. O resultado deve ser multiplicado por 10 para corrigir a diluição.

Nota: Valor do Hcy Calibrator- consulte a última página, a seguir à bibliografia para saber qual o valor atribuído.

Bibliography / Literatur / Bibliografia / Bibliographie / Bibliografia / Bibliografia / Litteratur / Litteraturförteckning / Βιβλιογραφία






1. Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, Johnston C, Engbaek F, Schneede J, McPartlin C, Scott JM. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. Clin Chem 2004; 50 (1):3-32
2. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. J Nutr Biochem 1990; 1:228-237.
3. Mudd SH, et al. Disorder of Transsulfuration. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, et al., eds. The metabolic basis of inherited disease New York: McGraw-Hill, 1995: 1297-1327.
4. Boushey, Carol J, et al. A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease, JAMA, October 4, 1995-Vol 274, No. 13: 1049-1057.
5. Allen, Robert H, et al. Diagnosis of Cobalamin Deficiency I: Usefulness of Serum Methylmalonic Acid and Total Homocysteine Concentrations, American Journal of Hematology 1990; 34:90-98.
6. Stabler, Sally P, et al. The Use of Homocysteine and Other Metabolites in the Specific Diagnosis of Vitamin B-12 Deficiency J Nutr 126: 1266S-1272S, 1996.
7. Guttormsen AB, Svarstad E, Ueland PM, Refsum H. Elimination of homocysteine from plasma in subjects with end-stage renal failure. Irish J Med Sci 1995; 164 (Suppl. 15): 8.
8. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease (ESDR): Prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. Kidney Int 1997; 52:10-20.
9. Clinical Laboratory Standards Institute/NCCLS. Preparation and Testing of Reagent Water in the Clinical Laboratory, Third Edition, CLSI/NCCLS Document C3-A3; Vol. 17 No. 18.
10. Clinical Laboratory Standards Institute/NCCLS. Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays, Fourth Edition, CLSI/NCCLS Document H21-A4; Vol. 23 No. 35.
11. Zucker S, Cathey MH, West B. Preparation of Quality Control Specimens for Coagulation, Am J Clin Pathol 1970; 53: 924-927.
12. Westgard JO, Barry PL. Cost-Effective Quality Control: Managing the Quality and Productivity of Analytical Processes, AACC Press 1986.
13. Refsum H, Ueland PM, Svardal M. Fully Automated Fluorescence Assay for Determining Total Homocysteine in Plasma. Clin Chem 1989; 35:1921-27.
14. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. Clin Chem 1993; 39: 263-271.
15. Primus FJ, Kelly EA, Hansen HJ, et al. "Sandwich"- Type Immunoassay of Carcinoembryonic Antigen in Patients Receiving Murine Monoclonal Antibodies for Diagnosis and Therapy. J Clin Chem 1988; 34: 261-4.
16. Schroff RW, Foon KA, Beatty SM et al. Human Anti-Murine Immunoglobulin Responses in Patients receiving Monoclonal Antibody Therapy. Cancer Res 1985; 45: 879-85.
17. Davis RE. Clinical chemistry of vitamin B12. Adv Clin Chem 1985; 24: 163-216.
18. Compatibility of the Abbott IMx Homocysteine Assay with Citrate-Anticoagulated Plasma and Stability of Homocysteine in Citrat Whole Blood. Clin Chem 2001; 47: 1704-1707.
19. Solberg HE. Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values. Part 5. Statistical Treatment of Collected Reference Values. Determination of Reference Limits. J Clin Chem Clin Biochem 1987; 25: 645-656
20. Clinical Laboratory Standards/NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Clinical Devices- Second Edition; Tentative Guideline. CLSI/NCCLS Document EP5-T2. Villanova, PA: CLSI/NCCLS, March 1992.

EP and US Patents
EP 623174/US 5631127/US 5827645, US 5958717/US6063581

ACL, ACL Futura and ACL TOP are trademarks of Instrumentation Laboratory.

©2006 Instrumentation Laboratory
Issued October 2006

Symbols used / Verwendete Symbole / Símbolos utilizados / Symboles utilisés / Simboli impiegati / Símbolos utilizados / Anvendte symboler / Använda Symboler / Χρησιμοποιηθέντα σύμβολα

REFERENCE VALUE		Reference value / Referenzwert / Valor de referencia / Valeurs de référence / Valori di riferimento / Valores de referência / Reference Værdi / Referens värde / Τιμή αναφοράς						
IVD	LOT				CONTROL			EC REP
<i>In vitro</i> diagnostic medical device	Batch code	Use by	Temperature limitation	Consult instructions for use	Control	Biological risks	Manufacturer	Authorised representative
<i>In-vitro</i> Diagnostikum	Chargen-Bezeichnung	Verwendbar bis	Festgelegte Temperatur	Beilage beachten	Kontrollen	Biologisches Risiko	Hergestellt von	Bevollmächtigter
De uso diagnóstico <i>in vitro</i>	Identificación número de lote	Caducidad	Temperatura de Almacenamiento	Consultar la metódica	Control	Riesgo biológico	Fabricado por	Representante autorizado
Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>	Désignation du lot	Utilisable jusqu'à	Temperatures limites de conservation	Lire le mode d'emploi	Contrôle	Risque biologique	Fabricant	Mandataire
Per uso diagnostico <i>in vitro</i>	Numero del lotto	Da utilizzare prima del	Limiti di temperatura	Vedere istruzioni per l'uso	Controllo	Rischio biologico	Prodotto da	Rappresentanza autorizzata
Dispositivo médico para utilização em diagnóstico <i>in vitro</i>	Número de lote	Data limite de utilização	Límite de temperatura	Consultar as instruções de utilização	Controlo	Risco biológico	Fabricado por	Representante autorizado
"in vitro" diagnostisk udstyr	Batch nr.	Anvendelse	Temperatur	Se vejledning for anvendelse	Kontrol	Miljø oplysninger	Producent	Leverandør
<i>In vitro</i> diagnostisk medicinsk produkt	Tillevkningskod	Användning	Límite de temperatura	Ta del av instruktionerna före användning	Kontroll	Biologiska risker	Tillverkare	Auktoriserad representant
Προϊόν για διαγνωστική χρήση <i>In vitro</i>	Αρ. Παρτίδας	Χρήση έως	Temperatur begrænsninger	Συμβουλευτήτε τις οδηγίες χρήσης	Υλικό ποιοτικού ελέγχου	Βιολογικοί κίνδυνοι	Κατασκευαστής	Εξουσιοδοτημένος αντιπρόσωπος
			Temperatur gräns					
			Περιορισμοί θερμοκρασίας					