



Revista del Laboratorio Clínico

Rev Lab Clin. 2008;1(1):13-6

www.elsevier.es/LabClin



Originales

Evaluación de un método inmunonefelométrico competitivo para la cuantificación de la homocisteína

Ana María Fernández Ramos, María Jesús Segovia Cuevas, Andrés Cobos Díaz y Alfredo Enguix Armada

Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Virgen de la Victoria. Málaga. España.

Historia del artículo:

Recibido el 14 de octubre de 2007.

Aceptado el 11 de febrero de 2008.

Palabras clave:

Homocisteína.

Método de medida.

Nefelometría.

Enfermedad vascular.

Key words:

Homocysteine.

Evaluation methodology.

Nephelometry method.

Vascular diseases.

RESUMEN

Introducción y objetivos. La homocisteína se relaciona con enfermedad vascular, alteraciones del estado nutricional y detección de homocistinuria en neonatos, entre otras enfermedades. Debido a la importancia de su determinación, han aparecido diferentes métodos de cuantificación; el objeto de este trabajo es evaluar el método inmunonefelométrico del aparato BN II (Dade Behring).

Material y método. Se realizó una comparación entre 2 métodos de cuantificación: el inmunoanálisis competitivo (IMMULITE 2000, DPC) y el análisis nefelométrico (BN II, Dade Behring), para lo cual se compararon los resultados de 74 muestras, además de determinar la imprecisión intraserial, imprecisión interdiaria, el límite de detección, el límite de cuantificación y el valor crítico del método inmunonefelométrico del BN II de Dade Behring.

Resultados. La comparación entre ambos métodos mostró una buena correlación entre el inmunoanálisis competitivo, IMMULITE 2000 de DPC y el análisis nefelométrico, BN II de Dade Behring ($Y = 1,4825 + 0,8342X$). El valor crítico obtenido fue de $5,46 \mu\text{mol/l}$ y el límite de detección, de $5,77 \mu\text{mol/l}$. La imprecisión intraserial fue inferior al 5% (3,65-4,66%).

Conclusiones. El análisis nefelométrico (BN II, Dade Behring) ha demostrado cumplir todos los requisitos técnicos necesarios para su validación como método para la determinación de la homocisteína.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. Todos los derechos reservados.

ABSTRACT

Evaluation of a competitive immunonephelometric method for the measurement of homocysteine

Introduction. The homocysteine is associated with vascular diseases, alterations in the nutritional states, homocystinuria detection in neonates, as well as other diseases. Due to the importance of its determination, different measurement methods have been developed. The aim of this work is to evaluate the immunonephelometric method used in the Dade Behring BN II Nephelometer system.

Material and method. We present a comparison between 2 methods: a competitive immunoassay (IMMULITE 2000, DPC) and the nephelometric test (BN II, Dade Behring). For the determination of within batch and between-day imprecision, 74 samples were analysed and compared.

Results. The detection and quantification limits, and the critical value of the immunonephelometric method, were also determined. Both methods showed good correlations ($Y = 1.4825 + 0.8342X$). We also obtained a critical value of $5.46 \mu\text{mol/L}$ and the detection limit was $5.77 \mu\text{mol/L}$. Within batch imprecision was below 5% (3.65-4.66%).

Conclusions. The nephelometric test (Dade Behring BN II System) has demonstrated to fulfill all the technical requirements needed for its validation as a method for the determination of homocysteine.

© 2008 AEBM, AEFA y SEQC. All rights reserved.

Correspondencia:

Dra. A.M. Fernández Ramos.

Tirso de Molina, 12, 3.º B. 29013 Málaga. España.

Correo electrónico: AMFRLAB@telefonica.net

Introducción

La homocisteína fue descubierta en 1939 por Du Vigneaud et al, pero no fue hasta 1969 cuando, gracias a McCully, se estableció la relación entre la enfermedad vascular y los valores elevados de homocisteína en plasma. A partir de ese momento son muchos los estudios realizados, entre los que destaca, tal vez, el publicado en *JAMA* en 1997¹, donde se concluyó que “el aumento de valor plasmático de homocisteína confiere un riesgo de enfermedad vascular (aterosclerosis prematura, trombosis recurrentes de arterias coronarias, cerebrales o periféricas y de la trombosis venosa) independiente de otros factores, similar al de la hiperlipemia o el tabaquismo. Además, incrementa de forma muy marcada este riesgo si va asociado a tabaquismo y a hipertensión”².

Pero, aunque se considera que ésta es la principal función de la homocisteína como marcador independiente de riesgo cardiovascular, son otras muchas las aplicaciones de la determinación de la homocisteína, como las relacionadas con alteraciones del estado nutricional (déficit de cobalamina y folatos, alcoholismo, embarazo, síndromes de malabsorción), la detección de la homocistinuria en los neonatos (debido generalmente al déficit de la enzima cistationina-beta sintetasa que se correlaciona con incrementos exacerbados de la homocisteína en plasma) y las relaciones entre la elevación de sus valores y diversas enfermedades (fallo renal, psoriasis, algunos pacientes con leucemia o tumores sólidos, hipertiroidismo, síndrome de Down) o fármacos (óxido nítrico, algunos antiepilépticos, metotrexato...) ³⁻⁶.

Los mecanismos por los que la hiperhomocisteinemia ocasiona alteraciones vasculares se detallan a continuación.

1. Producción de radicales superóxidos que producen lesión del endotelio arterial.
2. Capacidad para producir alteraciones de la coagulación.
3. Producción de células inflamatorias en las paredes arteriales que, junto con la dificultad para producir la dilatación de las arteriolas, favorece su obstrucción.
4. La forma activa de homocisteína, tiolactona presenta la capacidad de estimular la formación de agregados plaquetarios^{1,4,7}.

Objetivos

Realizar una comparación entre dos métodos para la determinación de homocisteína: uno ampliamente validado y empleado en la actualidad, el inmunoanálisis competitivo (quimioluminiscente con ésteres de acridinio, IMMULITE 2000, DPC) y un nuevo método basado en el análisis nefelométrico (competitivo, BN II, Dade Behring).

Material y método

Instrumentación

El análisis competitivo por nefelometría (Dade Behring) efectuado por el aparato BN II reduce la homocisteína enlazada en la muestra a homocisteína libre por medio de ditiotritol, y en la siguiente etapa se transforma enzimáticamente en S-adenosilhomocisteína (SAH). La S-adenosilhomocisteína (SAC) conjugada, añadida al comienzo de la reacción, competirá con la SAH de la muestra en la unión a los anticuerpos anti-SAH (fabricados por Dade Behring) unidos a las partículas de poliestireno. La valoración se realiza por comparación con los patrones de concentración conocida⁸.

El inmunoanálisis competitivo (DPC) efectuado con el aparato IMMULITE 2000 consta de 2 ciclos: uno de 30 min de duración, en el que se produce una liberación de la homocisteína unida y conversión a SAH, y otro en el que se lleva a cabo la inmunorreacción.

A una bola de poliestireno recubierta de SAH y fosfatasa alcalina se le une un anticuerpo específico para SAH, de modo que la SAH

transformada de la muestra pretratada compite con la SAH inmovilizada por la unión al anticuerpo anti-SAH unido a fosfatasa alcalina.

El conjugado enzimático no unido es eliminado mediante un lavado por centrifugación, a la vez que se añade más sustrato y continúa el proceso como el resto de los inmunoanálisis⁹.

El inmunoanálisis competitivo (DPC) efectuado con el aparato IMMULITE 2000 puede verse afectado en las determinaciones por fármacos que contengan S-adenosilmetionina, así como compuestos de la familia de la carbamazepina, fenitoína, 6-azuridina, antopterina, metotrexato, óxido nítrico, otros anticonvulsivos y los anticuerpos heterofílicos en el suero⁹.

El análisis competitivo por nefelometría (Dade Behring) efectuado por el aparato BN II se ve afectado por la turbidez, la lipemia, los anticuerpos heterofílicos, el factor reumatoide, los antiepilépticos, los antifolatos anestésicos y los antagonistas de la vitamina B₁₂⁹.

Reactivos

Ambos métodos emplean una serie de reactivos comunes, como S-adenosil-L-homocisteína, ditiotritol, anticuerpos monoclonales anti-SAH de ratón y S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa.

Las principales diferencias entre los métodos son:

1. El empleo, en el inmunoanálisis competitivo (DPC) IMMULITE 2000, de ajustadores de homocisteína en 2 niveles (bajo y alto) de 2 ml cada uno de SAH derivada sintéticamente en una matriz de proteína/búfer y diluyente de homocisteína, para dilución de muestras de alta concentración, para lo que se suministran 25 ml de una matriz proteica libre de homocisteína⁸.
2. En el análisis competitivo por nefelometría (Dade Behring) efectuado en el aparato BN II, la utilización de N HCY SR B 1,1 ml, en solución tamponada y estabilizada de un conjugado de SAC y tiroglobulina de cerdo (PTG-SAC) (< 0,1 g/l)⁹.

Procedimiento

En primer lugar, se procedió a valorar la técnica de análisis competitivo por nefelometría (Dade Behring) efectuado por el aparato BN II, mediante la determinación de la imprecisión intraserial, la imprecisión interdiaria y la determinación del límite de detección para, posteriormente, poder proceder a detectar los valores aberrantes, estimar el valor crítico (Lc), el límite de detección (Ld) y el límite de cuantificación (Lq).

Por último, se finalizó el estudio con una determinación simultánea en los aparatos IMMULITE 2000 y BN II de 74 muestras. La cantidad mínima de plasma necesaria para la medición fue de 100 µl de plasma para el aparato BN II y de 15 µl de plasma para el IMMULITE 2000.

1. Para el estudio de la imprecisión intraserial se procedió, tras la realización de la curva de calibración realizada con N Protein Standard SL 1 ml, a medir los 3 valores de control, empleándose N/T Protein Controls SL/L, SL/M y SL/H, que correspondían, respectivamente, a los controles bajo, medio y alto (suministrados en pack de 3 viales cada uno de 1 ml), introduciendo el control bajo 33 veces consecutivas, el medio 34 y el alto 33 en el mismo día, y empleándose los mismos reactivos y lotes.

2. La imprecisión interdiaria se evaluó por medio de controles alto, medio y bajo 20 veces, respectivamente, a lo largo de días consecutivos.

3. Ld. Se empleó un blanco compuesto por albúmina bovina en solución al 30% (Imumed, Bammmental, Alemania), diluyéndola al 5% con PBS (Becton Dickinson, Bélgica), compuesto por cloruro sódico, EDTA disódico, cloruro potásico, fosfato potásico monobásico y fosfato sódico dibásico (n = 30).

Se calcularon: a) valores aberrantes; b) Lc; c) Ld, y d) Lq. Para la detección de la posible presencia de valores aberrantes, se siguieron

las recomendaciones^{10,11} consistentes en ordenar los resultados de menor a mayor y seleccionar los 2 valores menores (X1 y X2) y los 2 mayores (Xn y Xn - 1).

- X1 se considera aberrante si $(X2 - X1) > (Xn - X1) / 3$.
- Xn se considera aberrante si $(Xn - Xn - 1) > (Xn - X1) / 3$.

En este caso, ni X1 ni Xn fueron aberrantes y no fue preciso eliminar ninguno de los valores obtenidos con el blanco.

Para la determinación del Lc se calculó la desviación típica del blanco (S0), escogiendo un error α de 0,05 y suponiendo una distribución normal de los resultados; el Lc se calculó con la siguiente fórmula¹⁰: $Lc = media + 1,645 \times S0$. La estimación del Ld, considerando un error β = 0,05⁹, se calculó con la siguiente fórmula: $Ld = media + 3,29 \times S0$.

Para el Lq se procedió a emplear la siguiente fórmula, presuponiendo una imprecisión máxima a valores bajos del 10% y suponiendo que la desviación típica se mantiene constante entre el valor cero y el del límite de cuantificación:

$$Lq = media + 10 \times SO = 5,15 + 10 \times 0,19 = 7,05$$

$$CV = 100 \times SO/Lq = 100 \times 0,19 / (10 \times 0,19) = 10\%.$$

Muestras

n = 74 por ambos métodos:

1. Obtención de plasma introduciendo las muestras en hielo o en nevera a 4 °C inmediatamente después de la extracción y separando la fracción celular rápidamente antes de los 20 min de su extracción.

2. Congelación de las muestras a -20 °C para su posterior medición (en las muestras a temperatura ambiente más de 4 h se produce un incremento del 35% de los valores de la homocisteína)^{6,12}.

Tratamiento estadístico

Para el estudio comparativo entre los 2 métodos se empleó el paquete estadístico Excel, Microsoft Office 2000, y regresión de Passing-Bablok (MEDCAL 4.020.021).

Resultados

Los resultados de las imprecisiones intradía e interdía se muestran en las tablas 1 y 2, respectivamente.

La correlación entre los 2 métodos fue: $Y = 1,4825 + 0,8342X$ (INMULITE) (fig. 1). Los intervalos de confianza del 95% para la coordenada en el origen y la pendiente fueron: 0,355-2,238 y 0,739-0,9515, respectivamente.

Empleando las fórmulas mencionadas en el apartado de "Material y método" se obtuvo un Lc = 5,46 $\mu\text{mol/l}$; un Ld = 5,77 $\mu\text{mol/l}$, y un Lq = 7,05 $\mu\text{mol/l}$.

Discusión

Se trata de un método que cumple las especificaciones de calidad analítica en cuanto a los CV intradía e interdía⁶, y el CV interdía es menor que el de las especificaciones mínimas recomendadas por la SEQC¹³: un 5,8% para la homocisteína.

Los resultados se correlacionan bien con el método tomado como referencia para este estudio (INMULITE), si bien no hay una transferibilidad directa entre ambos métodos, al no incluir el cero en la coordenada en origen ni el 1 en la pendiente de la recta de regresión.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio comparados con los descritos por Zappacosta et al¹⁴, así como con los ofrecidos por

Tabla 1

Valores de la imprecisión intraserial obtenidos por nuestro laboratorio y Zappacosta et al, con el analizador BN II (Dade Behring)

	Alto	Medio	Bajo
CV 1 (Zappacosta et al) (%)	4,20 ^a	3,7 ^a	4,3 ^a
CV 2 (Dade Behring) (%)	4,60 ^b	3,4 ^b	4,5 ^b
CV 3 (Hospital Virgen de la Victoria) (%)	4,66 ^c	4,4 ^d	3,65 ^c

CV 1: coeficiente de variación obtenido por Zappacosta et al; CV 2: coeficiente de variación obtenido por el fabricante; CV 3: coeficiente de variación obtenido por nuestro laboratorio.

^aTamaño muestral = 20.

^bTamaño muestral = 40.

^cTamaño muestral = 33.

^dTamaño muestral = 34.

Tabla 2

Estudio de la imprecisión interdiaria del analizador BN II obtenidos por Zappacosta et al, el fabricante (Dade Behring) y nuestro laboratorio

	Alto	Medio	Bajo
CV 1 (Zappacosta et al) (%)	5,2 ^a	4,8 ^a	6,2 ^a
CV 2 (Dade Behring) (%)	3,7 ^b	5,6 ^b	7,3 ^b
CV 3 (Hospital Virgen de la Victoria) (%)	6,73 ^c	6,55 ^c	6,77 ^c

CV 1: coeficiente de variación obtenido por Zappacosta et al; CV 2: coeficiente de variación obtenido por el fabricante; CV 3: coeficiente de variación obtenido por nuestro laboratorio.

^aTamaño muestral = 20.

^bTamaño muestral = 40.

^cTamaño muestral = 20.

el fabricante, son los presentados en la tabla 2, y son similares en los 3 casos.

El Ld o valor mínimo detectable^{11,15} obtenido por Zappacosta et al fue de 0,5 frente a 5,775 $\mu\text{mol/l}$ obtenido por nosotros, más de 10 veces superior. Esta diferencia podría deberse al diferente sistema empleado para la elaboración del blanco, ya que Zappacosta et al¹⁴ emplearon 3 muestras de plasma, con una concentración ya establecida de homocisteína, a las que se añadió L-homocisteína en cantidades conocidas, para posteriormente medirlas y establecer la diferencia entre los valores iniciales y los finales, obteniendo de este modo el porcentaje de recuperación.

En cambio, nosotros elaboramos una solución de albúmina bovina al 30% de Imumed (Bammental, Alemania), diluyéndola al 5% con PBS (Becton Dickinson, Bélgica), compuesto por cloruro sódico, EDTA disódico, cloruro potásico, fosfato potásico monobásico y fosfato sódico dibásico, procediendo a medirla 30 veces consecutivas en el mismo día y empleando los mismos reactivos.

Según la Comisión de Metrología de la SEQC en sus "Recomendaciones para el estudio de la capacidad de detección de los procedi-

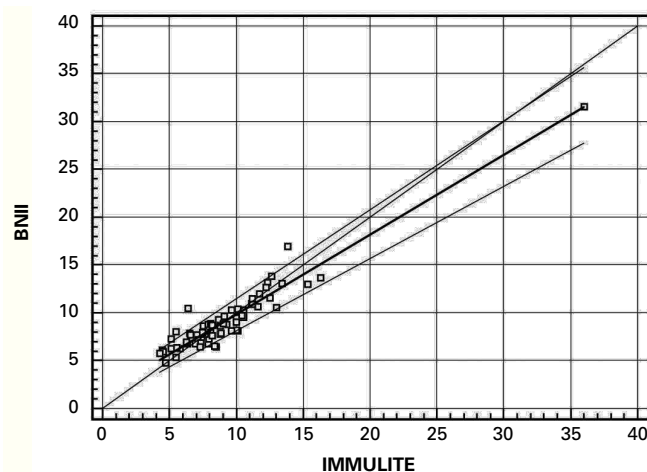


Fig. 1. Recta de regresión de Passing-Bablok de muestras analizadas con el aparato INMULITE 2000 y BN II.

mientos de medida en el laboratorio clínico¹¹, la principal causa de errores en la estimación de los límites indicados es una selección inadecuada del material del blanco, por lo que debe emplearse un material que carezca del analito y en el que la concentración de la magnitud de medida sea cero.

Aunque en ocasiones es posible emplear agua o solución salina, es conveniente que el blanco tenga una composición lo más parecida posible a las muestras de los pacientes. Las recomendaciones de la SEQC para la preparación del material blanco aparecen publicados por Canalias Reverter¹⁰ y en nuestro caso (suero), consiste en preparar una solución de albúmina sérica bovina 50 g/l y cloruro sódico 154 mmol/l. Hay que destacar que el Lq (7,05 $\mu\text{mol/l}$) es superior al límite inferior de la normalidad recomendado por el propio fabricante (4,9 $\mu\text{mol/l}$).

En cuanto a la practicabilidad, un inconveniente es la escasa duración de sus reactivos (14 días si están en el frigorífico una vez abiertos y reconstituidos o 3 días, 8 h por día, o un tiempo comparable, si están en el aparato), así como la de sus controles (14 días si se conservan en frío) y de su calibración (1 mes).

Bibliografía

- Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma Homocysteine as a risk factor for vascular disease. The European Concerted Action Project. JAMA. 1997;277:1775-81.
- Determinación de la homocisteína plasmática y valores de referencia (*on line*) 2006. citado 2 Sep 2006]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos12/homocis>
- Blanco F, Deulofeu R, Vilaseca MA, Chacon P, Dulin E. Determinación de homocisteína en plasma: metabolismo, metodología, interpretación de resultados y papel en la evaluación del riesgo vascular. Revisión. Grupo de trabajo sobre hiperhomocisteinemia moderada, de la SEQC. Química Clínica. 2002;21:243-50.
- Ueland PM, Refsum H, Sabatier SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. Clin Chem. 1993;39:1764-79.
- Homocysteine Studies Collaboration. Homocysteine and risk of ischemic heart disease and stroke: a meta-analysis. JAMA. 2002;288:2015-22.
- Refsum H, Smith AD, Ueland PM, Nexø E, Clarke R, McPartlin J, et al. Facts and recommendations about total homocysteine determinations: an expert opinion. Clinical Chem. 2004;50:3-32.
- Escalona TM. Homocisteína. Laboratorio (on line) 2006 [citado 2 Sep 2006]. Disponible en: <http://www.labnutricion.cl/homocis.html>
- Ficha técnica de Homocysteine IMMULITE 2000 (versión de junio de 2006).
- Ficha técnica de N Latex HCY Dade Behring (versión de mayo de 2006).
- Canalias Reverter F. Recomendaciones para el estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Documento de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Comité científico, Comisión de Metrología. Documento B. Fase 3. Versión 1.
- Sánchez M, Gella FJ. Recomendaciones para el estudio de la capacidad de detección de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. Documento de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, Comité científico, Comisión de Metrología. Documento C. Fase 3. Versión 1. Química Clínica. 2004;23:439-41.
- Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other tions in plasma and urine: automated determination and simple stability. Clin Chem. 1993;39:263-71.
- Base de datos del Comité de Garantía de la Calidad y Acreditación de Laboratorios. Comisión de Calidad Analítica. SEQC; 2004.
- Zappacosta B, Persichilli S, Minucci A, Scribano D, Antenucci M, Fasanella S, et al. Analytical evaluation of a new immunonephelometric method for homocysteine measurement. Clin Chim Acta. 2007;375:165-8. Disponible en: www.sciencedirect.com
- Gella FJ. Responsabilidades en la obtención de evidencia objetiva para la validación de las características metrológicas de los procedimientos de medida del laboratorio clínico. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comité Científico. Comisión de Metrología. Documento A, Fase 3, Versión 4. Química Clínica. 2003;22:33-5.