

Kit per la determinazione quantitativa della omocisteina nel siero e plasma - Metodo enzimatico

PRINCIPIO

L'omocisteina (HCY) è un tioaminoacido prodotto a livello intracellulare dalla demetilazione della metionina. Nel plasma è presente principalmente nella forma ossidata legata alle proteine ed in misura minore nella forma libera ridotta.

L'omocisteina totale T(HCY) è la somma delle frazioni libera e legata alle proteine. Livelli elevati di omocisteina sono considerati un importante fattore per la valutazione del rischio di patologie cardiovascolari⁽¹⁻³⁾. A causa della sua natura irritante, eccessi di HCY nel circolo sanguigno possono causare danni alle arterie dando origine a fenomeni infiammatori e alla formazione di placche che potrebbero impedire l'afflusso di sangue al cuore.

Elevati livelli di Omocisteina sono causati da quattro principali fattori:

- Deficit genetici degli enzimi coinvolti nel suo metabolismo, quali cistatione beta-sintetasi (CBS), metionina sintetasi (MS) e metilentetraidrotolofolati riduttasi (MTHFR).
- Carezza di vitamine del gruppo B (B6, B12 e folati) dovuta a scarso apporto dietetico.
- Danni renali per difettosa clearance degli aminoacidi.
- Assunzione di farmaci interferenti con il suo metabolismo, quali ossido nitrico, metotrexate e fenitoina.

Livelli elevati di Omocisteina sono associati anche al morbo di Alzheimer⁽⁴⁾ ed all'osteoporosi⁽⁵⁾.

Il test enzimatico prevede il dosaggio quantitativo dell'Omocisteina (HCY) attraverso una cascata di reazioni enzimatiche che portano ad una diminuzione di assorbanza dovuta all'ossidazione del NADH a NAD⁺. La concentrazione di HCY nel campione è indirettamente proporzionale alla quantità di NADH convertito a NAD⁺ (ΔA_{340nm}). La reazione enzimatica si sviluppa come segue:

T(HCY) → (HCY)libera

(HCY)libera + SAM* $\xrightarrow{s\text{-Metiltransferasi}}$ Metionina + SAH**

SAH + NADH $\xrightarrow{\text{SAH Idrolasi + Adenosina deaminasi}}$ Inosina + NAD⁺
 $\xrightarrow{\text{Glutammatoideidrogenasi}}$

* SAM = S-Adenosil-metionina
 **SAH = S-Adenosil-omocisteina

COMPOSIZIONE

R1: S-adenosilmetionina SAM 0.1 mM; NADH 0.2 mM; TCEP 0.5 mM ; 2-oxoglutarato 5.0 mM.

R2: Glutammatoideidrogenasi 10 KU/L; SAH Idrolasi 3,0 KU/L; Adenosina deaminasi 5,0 KU/L; HCY metiltransferasi 5,0 KU/L.

CALIBRATORI: 2 livelli 2 x 0.5 ml

PREPARAZIONE

I Reattivi sono liquidi pronti all'uso.

I reattivi utilizzati devono essere limpidi, la torbidità è un segno di inquinamento degli stessi e non vanno quindi utilizzati. Se l'assorbanza iniziale è < 0.5 a 340nm il reattivo non è più utilizzabile.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Conservare a 2-8°C. Non congelare i reattivi. I Reattivi sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta, se evitate contaminazione ed evaporazione e conservati al riparo dalla luce. I flaconi devono essere aperti solo per il tempo necessario per prelevare la quantità desiderata, richiudi immediatamente.

CAMPIONI

Utilizzare siero fresco o plasma. Per questo test è importante centrifugare il campione in tempi rapidi per separare il siero/plasma dagli eritrociti. Se questo non è possibile, bisogna refrigerare i campioni e centrifugarli entro un'ora dal prelievo.

Non utilizzare campioni bemozzati, torbidi o molto lipemici.

Dopo separazione del siero/plasma dagli eritrociti l'omocisteina è stabile nel campione per 4 giorni a temperatura ambiente, 4 settimane a 2-8°C e 12 mesi a -20°C.

VALORI DI RIFERIMENTO

Uomo - Donna	≤15 µmol/L
--------------	------------

E' comunque consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri valori normali in funzione della popolazione e delle regioni in cui opera.

CONTROLLO DI QUALITÀ

E' consigliabile, nell'esecuzione della metodica, inserire dei sieri di controllo (SGM-REF. 20370) i cui valori di Omocisteina siano noti, per controllare la rispondenza dei dati ottenuti con quelli previsti e validare di conseguenza i dati.

PROCEDIMENTO

Cinetica a 37°C e 340 nm in decremento.

	Bianco	CAL 1	CAL 2	Campione
Reattivo 1	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl
Fisiologica	13 µl	-	-	-
Calibratore 1	-	13 µl	-	-
Calibratore 2	-	-	13 µl	-
Campione	-	-	-	13 µl

Miscelare ed incubare per 5 minuti a 37°C.
 Quindi aggiungere:

Reattivo 2	65 µl	65 µl	65 µl	65 µl
Miscelare e incubare a 37°C per 2.5 minuti. Leggere contro il bianco l'assorbanza (A ₁) a 340nm e poi leggere nuovamente dopo 2.5 minuti (A ₂).				

NOTE

- I volumi di reazione possono essere proporzionalmente modificati.
- Per concentrazioni superiori a 50 µmol/l diluire il campione 1:2 con soluzione fisiologica e moltiplicare il risultato per 2.

CALCOLO DEI RISULTATI

Plottare i valori di ΔA_{CAL} ($\Delta A = A_2 - A_1$) ottenuti per ciascun calibratore contro i rispettivi valori di concentrazione e costruire la retta di calibrazione. La conc. di Hcys nei campioni è calcolata attraverso l'interpolazione dei valori di ΔA_{camp} sulla retta di calibrazione.

ANALIZZATORI AUTOMATICI

E' possibile utilizzare il kit con qualunque tipo di analizzatore automatico per Chimica Clinica. I parametri applicativi per i più comuni analizzatori presenti in commercio sono disponibili su richiesta (Hitachi, Olympus, Beckman, Konelab, etc.).

CALIBRAZIONE

Utilizzare i calibratori 1 e 2 forniti per stabilire la curva di calibrazione. Utilizzare soluzione fisiologica o acqua distillata per stabilire il punto 0 di calibrazione (0 µmol/l) dove necessario.

I valori assegnati ai calibratori sono riportati sull'etichetta di ciascun flacone e sono lotto-dipendenti.

L'utilizzo di un solo calibratore con conseguente calibrazione lineare rappresenta una approssimazione della curva di calibrazione reale.

Sebbene sia consigliato di utilizzare entrambi i calibratori per ottenere la migliore accuratezza, l'uso di una calibrazione lineare è possibile, ma determina una riduzione sensibile dell'accuratezza.

La curva di calibrazione è valida almeno 5 giorni; si suggerisce però di ricalibrare il dosaggio qualora il Controllo di Qualità non fornisca risultati adeguati.

PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

I reattivi contengono componenti inattivi, quali conservanti (sodio azide o altri), tensioattivi etc. La concentrazione totale di questi componenti è inferiore ai limiti riportati dalle direttive CEE 67/548/EEC e 88/379/EEC sulla classificazione, l'imballaggio ed etichettatura delle sostanze pericolose. Tuttavia i reattivi devono essere trattati con cautela, evitandone l'ingestione, il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose.

Nell'utilizzo dei reattivi si raccomanda di seguire le norme di buona pratica di laboratorio.

SMALTIMENTO RIFIUTI

Attenersi alle norme locali per quanto riguarda lo smaltimento dei reattivi.

PRESTAZIONI DEL REATTIVO

Linearità

Il metodo è lineare tra 2 e 50 µmol/L.

Precisione

La precisione è stata valutata testando replicati di quattro campioni a differente concentrazione di Omocisteina.

I risultati ottenuti sono riportati nelle tabelle sottostanti.

Precisione "intra-assay" (entro-la-serie)

Campione	n	Media (µmol/l)	DS	CV%
Campione 1	40	7.0	0.32	4.57
Campione 2	40	12.0	0.22	1.83
Campione 3	40	15.6	0.47	3.01
Campione 4	40	29.0	0.70	2.41

Precisione "inter-assay" (tra-le-serie)

Campione	n	Media (µmol/l)	DS	CV%
Campione 1	40	7.0	0.42	6.00
Campione 2	40	12.0	0.59	4.92
Campione 3	40	15.6	0.80	5.12
Campione 4	40	29.0	0.75	2.59

Correlazione

Uno studio di correlazione fra questo metodo ed uno del commercio ha dato i seguenti risultati:

$$y = 0.94x + 1.05 \mu\text{mol/l} \quad r = 0.99$$

Interferenze

L'analisi delle interferenze è stata effettuata analizzando un campione di siero contaminato con diverse concentrazioni di sostanze normalmente presenti nel siero. Nella seguente tabella sono riportate le concentrazioni delle varie sostanze che hanno portato interferenze inferiori al 10%:

Bilirubina	40 mg/dl
Bilirubina coniugata	40 mg/dl
Trigliceridi	1000 mg/dl
Acido Ascorbico	10 mmol/l
Emoglobina	500 mg/dl
Cistationina	0.1 mmol/l

I pazienti che assumono metotrexate, carbamazepina, ferritina, ossido nitroso, anticonvulsivanti, triacetato di 6-azuridina potrebbero presentare livelli più elevati di Omocisteina, dovuti alle interferenze metaboliche con il metabolismo della stessa.

E' suggerita l'aggiunta di 3-deazadenosina per inibire la produzione di HCY negli eritrociti. Comunque, il presente test non può essere utilizzato su campioni contenenti 3-deazadenosina poiché essa inibisce uno dei principali enzimi utilizzati nel kit.

BIBLIOGRAFIA

1. Eikelboom JW et al. Ann Intern Med 131:363-75 (1999)
2. Scott J, Weir D. Q J Med 89: 561-3 (1996)
3. Nygard O, N Engl J Med 337(4) : 230-6 (1997)
4. Seshadri S. et al. N. Engl. J. Med. 346:477-483 (2002)
5. Mc Lean R. et al. N. Engl. J. Med. 350: 2042-2049 (2004)
6. Refsum H. Clinical Laboratory News May 2002, pp 2-14
7. Guttormsen AB et al. Am. J. Nutr. 124(10) :1934-41 (1994)
8. Vilaseca et al. Clin. Chem. 43 : 690-692 (1997)
9. Faure -Delanef et al. Am. J. Hum. Genet. 60 : 999-1001 (1997)
10. NCCLS Document, « Procedures for the collection of arterial blood specimens », Appr. Std., 3rd Ed. (1999).
11. EU-Dir 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of good laboratory practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.

SIMBOLOGIA**Consultare istruzioni per l'uso****Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79/CE)****Limiti temperatura di conservazione****Dispositivo medico-diagnostico in vitro****Fabbricante**

Kit for quantitative determination of homocysteine in serum and plasma - Enzymatic method

PRINCIPLE

Homocysteine (HCY) is a thiol-containing amino acid produced by the intracellular demethylation of methionine. Total homocysteine represents the sum of all forms including oxidized protein bound free. In blood it is present more in oxidized form joined to proteins than in free reduced form.

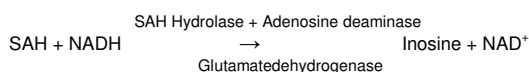
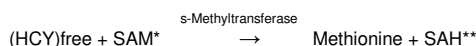
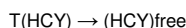
Elevated level of Homocysteine has emerged as an important risk factor in the assessment of cardiovascular disease⁽¹⁻³⁾. Excess HCY in the bloodstream may cause injuries to arterial vessels due to its irritant nature, and result in inflammation and plaque formation, which may eventually cause blockage of blood flow to the heart.

Elevated Homocysteine levels are caused by four major factors, including:

- Genetic deficiencies in enzymes involved in HCY metabolisms such as cystathionine beta-synthase (CBS), methionine synthase (MS), and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR).
- Nutritional deficiency in B vitamins (B6, B12 and folate)
- Renal failure for effective amino acid clearance
- Drug interactions such as nitric oxide, methotrexate and phenytoin that interfere with HCY metabolisms.

Elevated levels of T(HCY) are also linked with Alzheimer's disease⁽⁴⁾ and osteoporosis⁽⁵⁾.

The enzymatic test for the quantitative Homocysteine determination (HCY) is based on a series of enzymatic reactions causing a decrease in absorbance value due to NADH oxidation to NAD⁺. HCY concentration in the sample is directly proportional to the quantity of NADH converted to NAD⁺ (ΔA_{340nm}). The enzymatic reactions are the following:



* SAM = S-Adenosyl-methionine
**SAH = S-Adenosyl-homocysteine

COMPOSITION

R1: S-adenosylmethionine SAM 0.1 mM; NADH 0.2 mM; TCEP 0.5 mM; 2-oxoglutarate 5.0 mM.

R2: Glutamate dehydrogenase 10 KU/l; SAH hydrolase 3.0 KU/l; Adenosine deaminase 5.0 KU/l; HCY methyltransferase 5.0 KU/l.

CALIBRATORS: 2 Levels 2x1 ml

PREPARATION

The reagents are liquid ready to use.

The reagent used should be clear. It should be discarded and can not be used if it becomes turbid or the initial absorbance is less than 0.5 at 340 nm.

STORAGE AND STABILITY

Store at 2-8°C. Do not freeze the reagents. The reagents are stable up to the expiry date stated on the label if contamination and evaporation are avoided, protected from light. The vials must be open just only for the time to take the reagent, closed immediately.

SAMPLES

Use fresh serum or plasma. It is important to centrifuge blood samples immediately after collection to separate the plasma from the blood cells. If immediate centrifugation is not possible, collected blood specimens should be kept on ice and centrifuged within an hour. Hemolysed or turbid specimens or severely lipemic specimens are not recommended for HCY assay.

After separation of serum/plasma from cells, HCY is stable in the sample for 4 days if stored at room temperature, 4 weeks at 2-8°C, and 12 months at -20°C.

REFERENCE VALUES

Men - Women	≤15 µmol/L
-------------	------------

Each laboratory is recommended to establish a range of normal values for the population in their region.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use commercial Quality Control sera (SGM-REF.20370) with known Homocysteine concentration. Check that the values obtained are within the reference range provided.

ANALYTICAL PROCEDURE

Allow the reagents to room temperature before use.

	Blank	CAL 1	CAL 2	Sample
Reagent 1	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl
Saline	13 µl	-	-	-
Calibrator 1	-	13 µl	-	-
Calibrator 2	-	-	13 µl	-
Sample	-	-	-	13 µl
Mix and incubate for 5 minutes at 37°C.				
Then add:				
Reagent 2	65 µl	65 µl	65 µl	65 µl
Mix and incubate at 37°C for 2.5 minutes. Read against blank absorbance (A ₁) at 340nm and then read again after 2.5 minuti (A ₂).				

NOTE:

- Reaction volumes can be proportionally changed.
- Samples with values greater than 50 µmol/l should be diluted 1:2 and tested again. Multiply results by 2.

CALCULATIONS

Plot (A₂-A₁) obtained against the Hcys concentrations of both calibrators. Hcys concentration in the sample is calculated by interpolation of its (A₂-A₁) in the linear calibration curve.

AUTOMATIC ANALYZERS

The present kit can be used with any type of Clinical Chemistry automatic analyzer. Applications parameters for the most commons commercially available instruments are available upon request (Hitachi, Olympus, Beckman, Konelab, etc.).

CALIBRATION

Use the calibrator 1 and 2 for establish the calibration curve. Use saline or distilled water as calibration point 0 (0 µmol/l) where applicable or requested..

Assigned values are printed on the vials' label and are lot dependent.

Using only one calibrator (linear calibration) is an approximation of the actual calibration curve (non-linear calibration). Even if it is suggested to use both calibrators for establishing the calibration curve in order to achieve the best accuracy, using a linear calibration curve is possible, but it leads to a sensible reduction of the assay accuracy.

Calibration is stable up to 5 days. Anyway, it is suggested to recalibrate in case of the assay Quality Control gives non acceptable results.

PRECAUTIONS IN USE

The reagents contain inactive components such as preservatives (sodium azide or others), surfactants etc. The total concentration of these components is lower than the limits reported by 67/548/EEC and 88/379/EEC directives about classification, packaging and labelling of dangerous substances. However, the reagents should be handled with caution, avoiding swallowing and contact with skin, eyes and mucous membranes. The use of laboratory reagents according to good laboratory practice is recommended.

WASTE MANAGEMENT

Please refer to the local legal requirements.

ANALYTICAL PERFORMANCES

Sensitivity

Test sensitivity, in terms of limit of detection, is 0.4 µmol/l.

Linearity

The assay is linear up to 50 µmol/l.

Precision

Precision has been evaluated by testing replicates of four samples at different Homocysteine concentration.

The obtained results are reported in the following tables.

"Intra-assay" Precision (within-Run)

Sample	n	Mean (µmol/l)	SD	%CV
Sample 1	40	7.0	0.32	4.57
Sample 2	40	12.0	0.22	1.83
Sample 3	40	15.6	0.47	3.01
Sample 4	40	29.0	0.70	2.41

"Inter-assay" Precision (between-Run)

Campione	n	Mean (µmol/l)	SD	%CV
Sample 1	40	7.0	0.42	6.00
Sample 2	40	12.0	0.59	4.92
Sample 3	40	15.6	0.80	5.12
Sample 4	40	29.0	0.75	2.59

Correlation

A correlation study comparing the present method and a commercial one gave the following results:

$$y = 0.94x + 1.05 \mu\text{mol/l} \quad r = 0.99$$

Interferences

Interferences were tested with a serum sample spiked with various concentrations of substances normally present in the serum. In the following table, concentrations of different substances with interferences less than 10% are reported:

Bilirubin	40 mg/dl
Bilirubin conjugated	40 mg/dl
Triglycerides	1000 mg/dl
Ascorbic acid	10 mmol/l
hemoglobin	500 mg/dl
Cystathionine	0.1 mmol/l

Patients taking methotrexate, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide, anticonvulsants, or 6-azuridine triacetate may have high levels of HCY, due to the interference of this drugs with the Homocysteine metabolism.

Addition of 3-deazadenosine to inhibit HCY production in red cells has been suggested. However, the HCY assay can not use samples containing 3-deazadenosine since it inhibits one of the key enzyme used in the assay.

BIBLIOGRAPHY

1. Eikelboom JW et al. Ann Intern Med 131:363-75 (1999)
2. Scott J, Weir D. Q J Med 89: 561-3 (1996)
3. Nygard O, N. Engl J Med 337(4) : 230-6 (1997)
4. Seshadri S. et al. N. Engl. J. Med. 346:477-483 (2002)
5. Mc Lean R. et al. N. Engl. J. Med. 350: 2042-2049 (2004)
6. Refsum H. Clinical Laboratory News May 2002, pp 2-14
7. Guttormsen AB et al. Am. J. Nutr. 124(10) :1934-41 (1994)
8. Vilaseca et al. Clin. Chem. 43 : 690-692 (1997)
9. Faure –Delanef et al. Am. J. Hum. Genet. 60 : 999-1001 (1997)
10. NCCLS Document, « Procedures for the collection of arterial blood specimens », Appr. Std., 3rd Ed. (1999).
11. EU-Dir 1999/11 Commission Directive of 8 March 1999 adapting to technical progress the principles of good laboratory practice as specified in Council Directive 87/18/EEC.

SYMBOLS

Read instruction for use



CE mark (requirement of 98/79 regulation)



Storage temperature



In vitro medical device



Producer