

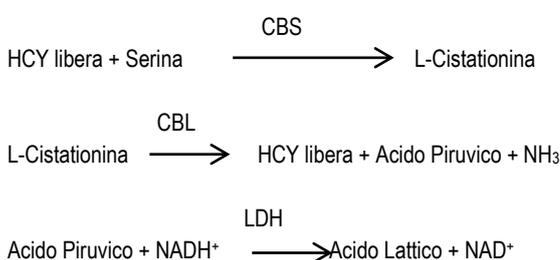
Determinazione Quantitativa della Omocisteina nel Siero o Plasma. Metodo enzimatico.

REF **CC1420** R1: 2x25mL + R2:1x5mL + R3/R4/R5: 3x1 mL (controlli) + R6/R7: 2x1 mL (calibratori)
CC1421 R1: 1x25mL + R2:1x2,5mL + R3/R4/R5: 3x0,5 mL (controlli) + R6/R7: 2x0,5 mL (calibratori)

PRINCIPIO DEL METODO

Metodo Enzimatico. 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.

Il test enzimatico prevede il dosaggio quantitativo dell'Omocisteina (HCY) con una cascata di reazioni enzimatiche che causano una diminuzione di assorbanza per l'ossidazione del NADH a NAD⁺. La concentrazione di HCY nel campione è inversamente proporzionale alla quantità di NADH convertito a NAD⁺ (ΔA 340nm).



SIGNIFICATO CLINICO

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 metilentetraidrofolato riduttasi (MTHFR).
- Carenza 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 ed all'osteoporosi.

COMPOSIZIONE REAGENTI

Reagente R1:

LDH (Lattico Deidrogenasi)	> 800 KU/L
Serina	1.3 mmol/L
NADH	1.0 mmol/L

Reagente R2:

CBS (Cistationina β-Sintetasi)	> 20 KU/L
CBL (Cistationina β-Litica)	> 10 KU/L

Reagente R3/R4/R5

Controlli Livello1-2-3	valore in etichetta
------------------------	---------------------

Reagente R6/R7

Calibratore 1-2	valore in etichetta
-----------------	---------------------

PREPARAZIONE REAGENTE E STABILITA'

Reagenti liquidi e pronti all'uso, stabili fino alla data di scadenza riportata, se conservati come riportato in etichetta e si evitano contaminazione, evaporazioni ed esposizione prolungata alla luce diretta.

Dopo l'apertura dei flaconi, la stabilità dei reagenti è di almeno un mese.

Non congelare i reagenti.

Scartare il reagente se appaiono segni di deterioramento come presenza di particelle e torbidità oppure mancato recupero dei valori di sieri di controllo certificati.

Dopo l'apertura dei flaconi, si consiglia di prelevare il volume necessario, di richiudere immediatamente i flaconi e di riportarli in frigo al fine di evitare contaminazione, degradazione da luce diretta ed evaporazione.

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 emolizzati, torbidi o molto lipemici.

Dopo separazione del siero/plasma dagli eritrociti, l'omocisteina è stabile nel campione per 2 giorni a 2-8°C.

PROCEDURA

Lunghezza d'onda:	340 nm
Temperatura:	37°C
Misura:	contro acqua distillata

Pipettare come segue:

Reagente1	250 µL
Campione /Calibratore	17 µL
Miscelare, incubare per 300 secondi, quindi aggiungere:	
Reagente 2	25 µL

Miscelare, incubare per 90 secondi. Leggere l'assorbanza (Abs1). Attendere altri 180 secondi e leggere ancora l'assorbanza (Abs 2). Calcolare il Δ Abs (Abs 2 – Abs 1) sia per campioni che calibratori.

CALCOLO

Plottere i valori di Δ Abs (Abs 2 – Abs 1) ottenuti per ciascun calibratore contro i rispettivi valori di concentrazione e costruire la curva di calibrazione. La concentrazione di Omocisteina nei campioni è calcolata attraverso l'interpolazione dei valori di Δ Abs di ogni campione sulla retta di calibrazione.

CALIBRAZIONE

I risultati dipendono dalla accuratezza della calibrazione, dal corretto settaggio del test sullo strumento, dal giusto rapporto volumetrico reagente/campione e dalla corretta temperatura di analisi.

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.

CONTROLLO DI QUALITA'

Sieri di controllo normali e patologici a concentrazione nota, devono essere analizzati regolarmente in ogni seduta analitica.

Per il Controllo di Qualità Interno (valutazione della Precisione o Ripetibilità) il materiale di controllo di qualità di MTD Diagnostics incluso nel kit. Per la valutazione della Accuratezza del metodo (Riproducibilità) è necessario aderire ad un programma di Valutazione Esterna Qualità' (VEQ) gestito da enti certificati.

VALORI DI RIFERIMENTO

Adulti 4,0 – 15,4 µmol/L

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire un range di valori attesi in base alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare il proprio intervallo di riferimento. A fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati insieme alla storia medica del paziente, all'esame clinico e ad altri risultati.

PRESTAZIONI

PRECISIONE:

Livello basso: Campioni= 20; Media = 12; D.S. = 0,22; CV = 1,83%

Livello alto: Campioni= 20; Media = 29; D.S. = 0,70; CV = 2,41%

ACCURATEZZA (CORRELAZIONE): Una comparazione tra questo metodo (x) ed un metodo certificato del commercio (y) ha dato la seguente correlazione:

$$y = 0.98 x + 1.12 \quad r = 0.990$$

SENSIBILITA': 1.0 µmol/L

LINEARITA': 1.0 – 50.0 µmol/L

SPECIFICITA' / INTERFERENZE

Le seguenti sostanze, fino alla concentrazione indicata, non hanno mostrato avere interferenze significative con il test:

Bilirubina	40 mg/dL
Bilirubina coniugata	40 mg/dL
Trigliceridi	500 mg/dL
Acido Ascorbico	30 mmol/L
Emoglobina	400 mg/dL

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

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.
- Il reagente può essere utilizzato con differenti strumenti. Ogni applicazione su strumenti dovrebbe essere validata per dimostrare che i risultati coincidano con le caratteristiche e prestazioni del metodo. Si raccomanda di controllare periodicamente lo strumento. Contattare il proprio fornitore per ogni problema relativo alla metodica applicativa.
- La diagnosi clinica non dovrebbe essere effettuata sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere integrata con dati clinici e di laboratorio.

PRECAUZIONI

Il prodotto non contiene altre sostanze o miscele pericolose secondo la regolamentazione CE n° 1272/2008 (CLP) ovvero le loro concentrazioni sono tali da non essere considerate persistenti, bioaccumulanti o tossiche (PBT). Pertanto, esso non è soggetto alla etichettatura speciale prevista dalla suddetta regolamentazione. Il prodotto è etichettato secondo la direttiva per la marcatura CE (98/79/CE). Sodio Azide inferiore a 0.1%.

Tuttavia, in osservanza alle normali norme di prudenza che ognuno deve osservare allorchè si maneggi qualunque sostanza chimica o reagente di laboratorio, in caso di contatto dei Reagenti con l'operatore, occorre applicare i seguenti interventi di primo soccorso:

S26 (P305 – P351 – P338): In caso di contatto con gli occhi, lavare immediatamente e abbondantemente con acqua e consultare il medico.

S28 (P302 – P352): In caso di contatto con la pelle, lavarsi immediatamente ed abbondantemente.

S36/37/39 (P280): Usare indumenti protettivi e guanti adatti e proteggersi gli occhi/la faccia.

S46 (P301 – P310): In caso d'ingestione consultare immediatamente il medico e mostrargli il contenitore o l'etichetta. Se la vittima è cosciente, lavare la bocca con acqua.

S56 (P273): Smaltire questo materiale e relativi contenitori in un punto di raccolta autorizzato per rifiuti pericolosi o speciali, applicando la legislazione vigente.

S63 (P304 – P340): In caso di incidente per inalazione, allontanare l'infortunato dalla zona contaminata e mantenerlo a riposo.

Tutti i campioni in esame, calibratori e controlli devono essere trattati come materiale potenzialmente infettivo capace di trasmettere HIV ed epatiti.

PER OGNI ALTRA INDICAZIONE, RICHIEDERE LA SCHEDA DI SICUREZZA COMPLETA AL PRODUTTORE.

SIMBOLOGIA

	Marchio CE (prodotto conforme ai requisiti della Dir. 98/79 CE)		
	Dispositivo medico diagnostico in vitro		Limiti temperatura di conservazione
	Consultare istruzioni per l'uso		Dimensione / numero test
	Numero di catalogo		Scadenza
	Numero di lotto		Fabbricante

BIBLIOGRAFIA

- Eikelboom JW et al. Ann Intern Med 131:363-75 (1999)
- Scott J, Weir D. Q J Med 89: 561-3 (1996)
- Nygaard O, N Engl J Med 337(4) : 230-6 (1997)
- Seshadri S. et al. N. Engl. J. Med. 346:477-483 (2002)
- Mc Lean R. et al. N. Engl. J. Med. 350: 2042-2049 (2004)