

REF	CONTENT		Analizzatori su cui il cobas c pack può essere impiegato
05385415 190	Homocysteine Enzymatic Assay, 100 test	N. d'ident. 07 7487 1	cobas c 311, cobas c 501/502
05385504 190	HCYS Calibrator Kit (2 x 3 mL)	Codice 590	
05142423 190	HCYS Control Kit, Controllo 1 (2 x 3 mL)	Codice 254	
	HCYS Control Kit, Controllo 2 (2 x 3 mL)	Codice 255	
04489357 190	Diluent NaCl 9 % (50 mL)	N. d'ident. 07 6869 3	

Italiano**Informazioni relative al sistema**

Per gli analizzatori **cobas c 311/501**:

HCYS: ACN 778

Per l'analizzatore **cobas c 502**:

HCYS: ACN 8778

Finalità d'uso

Test *in vitro* per la determinazione quantitativa dell'L-omocisteina totale nel siero e nel plasma umani, impiegando sistemi Roche/Hitachi **cobas c**. Il test può essere utile per la diagnosi di pazienti con sospetto di iperomocisteinemia o di omocistinuria.

Sommario^{1,2,3}

L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido contenente tiolo, prodotto mediante demetilazione intracellulare della metionina. L'omocisteina totale (tHcy) rappresenta la somma di tutte le forme dell'Hcy, comprese le forme ossidate, legata a proteine e libera.

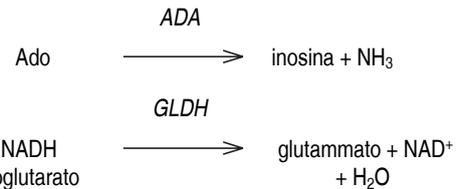
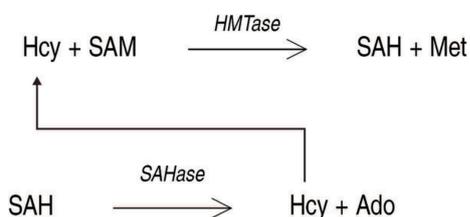
Livelli elevati di tHcy si sono rivelati un fattore di rischio importante nella valutazione delle malattie cardiovascolari.^{1,2,3} L'Hcy eccessiva nella circolazione sanguigna può provocare lesioni ai vasi arteriosi dovuto alle sue proprietà irritanti, e risultare in infiammazioni e formazione di placche, causando infine il blocco del flusso di sangue al cuore.

Livelli elevati di tHcy vengono causati dai seguenti quattro fattori principali:

1. insufficienze genetiche negli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'Hcy, quali cistationina beta-sintasi (CBS), metionina sintasi (MS) e metilene-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR);
2. carenza nutrizionale delle vitamine B, quali B₆, B₁₂ e folato;
3. insufficienza renale per una clearance efficace degli aminoacidi; e
4. interazioni con farmaci, quali ossido nitrico, metotrexato e fenitoina, che interferiscono con il metabolismo dell'Hcy. Livelli elevati di tHcy sono anche associati alla malattia di Alzheimer⁴, a patologie neuropsichiatriche⁵ e all'osteoporosi.⁶ Sono state stabilite delle linee guida per la determinazione della tHcy in laboratori clinici.^{7,8}

Principio del test

Il test HCYS è basato su un nuovo principio di test con cicli enzimatici che valuta il prodotto della conversione del co-substrato invece di valutare il co-substrato o i prodotti della conversione dell'Hcy. In questo test, l'Hcy ossidata viene prima ridotta all'Hcy libera, che poi reagisce con un co-substrato, S-adenosilmetionina (SAM), per formare, in una reazione catalizzata da un'Hcy S-metiltransferasi, metionina (Met) ed S-adenosilomocisteina (SAH). L'SAH viene valutata in reazioni enzimatiche accoppiate, essendo l'SAH idrolizzata in adenosina (Ado) e Hcy dall'SAH idrolasi, e l'Hcy viene ciclata nella reazione di conversione di Hcy, per formare un ciclo di reazione che amplifichi il segnale di rilevazione. L'Ado formatasi viene immediatamente idrolizzata in inosina e ammoniaca. Nell'ultima fase, l'enzima glutammato deidrogenasi (GLDH) catalizza la reazione dell'ammoniaca con il 2-chetoglutarato e l'⁺NADH, formando NAD⁺. La concentrazione di Hcy nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di NADH convertita in NAD⁺ ($\Delta A_{340\text{ nm}}$).

**Reattivi – soluzioni pronte all'uso****R1 Reagente di NADH**

S-Adenosilmetionina: 0.1 mmol/L, TCEP*: >0.5 mmol/L, 2-chetoglutarato: <5.0 mmol/L, NADH: >0.2 mmol/L, tampone, pH 9.1 (25 °C), conservante, stabilizzatore

R2 Reagente enzimatico

Omocisteina S-metiltransferasi (HMTasi): 5.0 kU/L, glutammato deidrogenasi (GLDH): 10 kU/L, caseina (bovina): ≤0.2 %, tampone, pH 7.2 (25 °C), conservante, detergente

R3 Reagente starter

Adenosina deaminasi (bovina): 5.0 kU/L, S-adenosil-omocisteina idrolasi (SAHasi): 3.0 kU/L, caseina (bovina): ≤0.2 %, tampone, pH 7.2 (25 °C), conservante, stabilizzatore

* Tris(2-carbossietil)fosfina

R1 si trova nella posizione A, R2 nella posizione B e R3 nella posizione C.

Precauzioni e avvertenze

Per uso diagnostico *in vitro*.

Osservare le precauzioni normalmente adottate durante la manipolazione dei reagenti di laboratorio.

Lo smaltimento di tutti i rifiuti deve avvenire secondo le direttive locali. Scheda dati di sicurezza disponibile su richiesta per gli utilizzatori professionali.

Utilizzo dei reattivi

Pronti all'uso.

Conservazione e stabilità**HCYS**

Stabilità a 2-8 °C:

Vedere la data di scadenza indicata sull'etichetta del contenitore portareagenti **cobas c** pack.

In uso e refrigerato a bordo dell'analizzatore:

4 settimane

Diluent NaCl 9 %

Stabilità a 2-8 °C:

Vedere la data di scadenza indicata sull'etichetta del contenitore portareagenti **cobas c** pack.

In uso e refrigerato a bordo dell'analizzatore:

12 settimane

Non congelare.

Prelievo e preparazione dei campioni

Per il prelievo e la preparazione dei campioni impiegare solo provette o contenitori di raccolta adatti.

Solo i tipi di campione elencati di seguito sono stati testati e risultano accettabili.

Siero.

Plasma: plasma con litio eparina, K₂-EDTA e K₃-EDTA.

È importante centrifugare i campioni di sangue immediatamente dopo il prelievo per separare il plasma dalle cellule ematiche. Se non è possibile la centrifugazione immediata, i campioni di sangue prelevati devono essere tenuti in ghiaccio e centrifugati entro 1 ora. Si sconsigliano campioni emolizzati o torbidi o fortemente lipemici per il test per l'Hcy.

I tipi di campione elencati sono stati testati impiegando una selezione di provette per il prelievo di campioni disponibili in commercio al momento dell'analisi; non sono, quindi, state testate tutte le provette disponibili di tutte le case produttrici. Alcuni sistemi per il prelievo di campioni di vari produttori possono contenere diversi materiali e in alcuni casi possono interferire sui risultati del test. Quando si trattano i campioni in provette primarie (sistemi per il prelievo di campioni), seguire le istruzioni del produttore delle provette.

Stabilità: ^{8,9,10}	4 giorni a 15-25 °C
	4 settimane a 2-8 °C
	10 mesi a -20 °C

I campioni contenenti precipitati devono essere centrifugati prima dell'esecuzione del test.

Per informazioni dettagliate relative alle possibili interferenze dai campioni, consultare la sezione "Limiti del metodo – interferenze".

Materiali a disposizione

Per i reattivi, vedere la sezione "Reattivi – soluzioni pronte all'uso".

Materiali necessari (ma non forniti)

Vedere la sezione "Informazioni per ordini".

Normale attrezzatura da laboratorio

Esecuzione

Per una performance ottimale del test, attenersi alle indicazioni riportate nel presente documento per l'analizzatore in questione. Per le istruzioni specifiche dell'analizzatore relative all'esecuzione del test, consultare il manuale d'uso dello strumento.

Roche non risponde delle performance delle applicazioni che non sono state validate dalla stessa Roche – tali performance devono quindi essere definite dall'utilizzatore.

Applicazione per il siero ed il plasma**Definizione del test per l'analizzatore cobas c 311**

Tipo di misura	2 Punti finale		
Tempo di reazione / punti di misura	10 / 36-57		
Lunghezze d'onda (sec./princ.)	700/340 nm		
Andamento della reazione	Decrescente		
Unità di misura	µmol/L		
Volumi dei reagenti	Diluyente (H ₂ O)		
R1	176 µL	–	
R2	28 µL	–	
R3	20 µL	–	
Volumi dei campioni	Campione	Diluizione del campione	
		Campione	Diluyente (NaCl)
Normale	14 µL	–	–
Ridotto (Diluito)	14 µL	30 µL	120 µL

Concentrato	14 µL	–	–
-------------	-------	---	---

Definizione del test per gli analizzatori cobas c 501/502

Tipo di misura	2 Punti finale		
Tempo di reazione / punti di misura	10 / 51-70		
Lunghezze d'onda (sec./princ.)	700/340 nm		
Andamento della reazione	Decrescente		
Unità di misura	µmol/L		
Volumi dei reagenti	Diluyente (H ₂ O)		
R1	176 µL	–	
R2	28 µL	–	
R3	20 µL	–	
Volumi dei campioni	Campione	Diluizione del campione	
		Campione	Diluyente (NaCl)
Normale	14 µL	–	–
Ridotto (Diluito)	14 µL	30 µL	120 µL
Concentrato	14 µL	–	–

Calibrazione

Calibratori	S1-5: HCYS Calibrator Kit
	Al fine di determinare le concentrazioni dello standard per la curva di calibrazione a 5 punti, moltiplicare il valore lotto-specifico del calibratore HCYS Calibrator Kit per i fattori indicati di seguito:
	S1: 0.050
	S2: 0.100
	S3: 0.250
	S4: 0.500
	S5: 1.00
Tipo di calibrazione	RCM
Frequenza di calibr.	Calibrazione completa
	• ogni 7 giorni
	• a cambio di lotto del reattivo
	• se richiesto dai procedimenti del controllo di qualità

L'intervallo di calibrazione può essere esteso in base a valori accettabili della verifica di calibrazione da parte del laboratorio.

Tracciabilità: questo metodo è stato standardizzato contro il materiale di riferimento SRM 1955 del NIST.

Controllo di qualità

Per il controllo di qualità, impiegare i materiali di controllo indicati nella sezione "Informazioni per ordini".

In aggiunta, è possibile utilizzare altro materiale di controllo appropriato.

Gli intervalli ed i limiti del controllo dovranno essere conformi alle esigenze individuali di ogni laboratorio. I valori ottenuti devono rientrare nei limiti definiti. Ogni laboratorio deve definire delle misure correttive da attuare nel caso che alcuni valori siano al di fuori dei limiti definiti.

Per il controllo di qualità, attenersi alle normative vigenti e alle linee guida locali.

Calcolo

I sistemi **cobas c** effettuano il calcolo automatico della concentrazione dell'analita di ciascun campione.

Limiti del metodo – interferenze

Criterio di valutazione: recupero entro ±10 % del valore iniziale per concentrazioni dell'analita > 15 µmol/L oppure ±1.5 µmol/L per concentrazioni dell'analita ≤ 15 µmol/L.

Ittero:¹¹ nessuna interferenza significativa fino ad un indice I di 20 per la bilirubina coniugata e non coniugata (concentrazione di bilirubina coniugata e non coniugata: ca. 342 µmol/L oppure 20 mg/dL).

Emolisi:¹¹ nessuna interferenza significativa fino ad un indice H di 100 (concentrazione di emoglobina: ca. 62 µmol/L oppure 100 mg/dL).

Lipemia (Intralipid):¹¹ nessuna interferenza significativa fino ad un indice L di 250. Non esiste una buona correlazione tra l'indice L (corrisponde alla torbidità) e la concentrazione di trigliceridi.

Farmaci: non si è osservata alcuna interferenza a concentrazioni terapeutiche impiegando le più comuni famiglie di farmaci.^{12,13}

Eccezioni: 0.5 mmol/L di glutazione, 100 µmol/L di cistationina, 0.5 mmol/L di piruvato.

I pazienti che assumono metotrexato, carbamazepina, fenitoina, ossido nitroso, anticonvulsivi o 6-azuridina triacetato, possono presentare livelli più alti di Hcy dovuti all'interferenza da parte del metabolismo dell'Hcy.^{7,10}

L'S-adenosilomocisteina (SAH) provoca un'interferenza positiva significativa. Tuttavia, l'SAH è rilevabile solo a concentrazioni sub-nmol/L nel plasma normale e, pertanto, non causerà probabilmente problemi.¹⁴

Per inibire la produzione di Hcy negli eritrociti, è stata suggerita l'aggiunta di 3-deazaadenosina. Nel test Homocysteine Enzymatic Assay non si possono, però, impiegare campioni contenenti 3-deazaadenosina in quanto essa inibisce uno degli enzimi principali utilizzati nella determinazione.

In casi molto rari, la gammopatia, particolarmente di tipo IgM (macroglobulinemia di Waldenström), può causare risultati inaffidabili.¹⁵

Ai fini diagnostici, i risultati devono sempre essere valutati congiuntamente con la storia clinica del paziente, con gli esami clinici e con altre evidenze cliniche.

AZIONI RICHIESTE

Programmazione extra lavaggi: è assolutamente necessario effettuare specifiche fasi di lavaggio se certe combinazioni di test vengono eseguite insieme sui sistemi **cobas c**. La versione più recente dell'elenco dei possibili carry-over si trova allegata alle metodiche NaOHD - SMS - SmpCln1+2 - SCCS. Per ulteriori istruzioni, consultare il manuale d'uso. Analizzatore **cobas c 502**: tutte le programmazioni di extra lavaggi richieste per evitare possibili carry-over sono disponibili tramite **cobas link**; in determinati casi è comunque necessario effettuare inserimenti manuali.

È necessario implementare la procedura di extralavaggio (qualora richiesta) prima di riportare i risultati di questo test.

Limiti ed intervalli

Intervallo di misura

3-50 µmol/L

Determinare i campioni con concentrazioni più alte con la funzione rerun. La diluizione dei campioni con la funzione rerun avviene nel rapporto 1:5. I risultati ottenuti sui campioni diluiti con la funzione rerun vengono automaticamente moltiplicati per il fattore 5.

Limiti inferiori di misura

Limite del bianco, limite di sensibilità e limite di quantificazione

Limite del bianco = 3 µmol/L

Limite di sensibilità = 3 µmol/L

Limite di quantificazione = 5.5 µmol/L

Il limite del bianco ed il limite di sensibilità sono stati determinati in conformità ai requisiti EP17-A del CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Il limite del bianco corrisponde al valore del 95° percentile ottenuto in n ≥ 60 misurazioni di campioni privi di analiti in varie serie indipendenti l'una dall'altra. Il limite del bianco corrisponde alla concentrazione al di sotto della quale si riscontrano campioni privi di analiti con una probabilità del 95 %.

Il limite di sensibilità viene determinato in base al limite del bianco e alla deviazione standard dei campioni con concentrazioni basse.

Il limite di sensibilità corrisponde alla concentrazione minima dell'analita che può essere rilevata (valore superiore al limite del bianco con una probabilità del 95 %).

Il limite di quantificazione rappresenta la concentrazione minima dell'analita che può essere misurata in modo riproducibile con un errore totale del 30 %. È stato determinato utilizzando campioni con basse concentrazioni di omocisteina.

Valori di riferimento

Nella maggior parte dei laboratori clinici negli USA, 15 µmol/L è usato come valore di cutoff per i livelli normali di Hcy in adulti.

Nei laboratori europei, 12 µmol/L è usato come valore di cutoff per i livelli normali di Hcy in adulti.⁸

L'età, una gravidanza e la funzionalità renale sono fattori importanti.

È inoltre necessario considerare l'assunzione di acido folico come supplemento o nella fortificazione alimentare:

Gruppo	Con folato supplementare	Senza supplementi
--------	--------------------------	-------------------

(valori di tHcy a digiuno / basale, µmol/L)

Donne gravide	8	10
Bambini (<15 anni)	8	10
Adulti (15-65 anni)	12	15
Persone anziane (>65 anni)	16	20

Ogni laboratorio deve controllare l'applicabilità dei valori di riferimento alla propria popolazione di pazienti e, se necessario, determinare intervalli di riferimento propri.

Dati specifici sulla performance del test

Qui di seguito sono riportati i dati rappresentativi delle prestazioni sugli analizzatori. I risultati dei singoli laboratori possono differire da questi.

Precisione

La precisione è stata determinata usando campioni umani e controlli, eseguiti in conformità ai requisiti EP5 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): ripetibilità (n = 21) e precisione intermedia (2 aliquote per serie, 2 serie al giorno, 21 giorni). Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Ripetibilità	Media	DS	CV
	µmol/L	µmol/L	%
Homocysteine Control 1	12.2	0.2	1.5
Homocysteine Control 2	39.1	0.7	1.8
Siero umano 1	8.26	0.16	2.0
Siero umano 2	13.1	0.2	1.8
Siero umano 3	30.0	0.4	1.4
Siero umano 4	44.4	0.9	2.0

Precisione intermedia

	Media	DS	CV
	µmol/L	µmol/L	%
Homocysteine Control 1	12.2	0.3	2.1
Homocysteine Control 2	39.1	0.8	2.0
Siero umano 1	8.26	0.19	2.3
Siero umano 2	13.1	0.3	2.1
Siero umano 3	30.0	0.5	1.8
Siero umano 4	44.4	1.0	2.2

Confronto tra metodi

I valori di Hcy ottenuti per campioni di siero umano sull'analizzatore **cobas c 501 (y)** sono stati confrontati con quelli determinati con il reagente corrispondente su un analizzatore COBAS INTEGRA 400 (x).

Dimensione (n) del campione = 56

Passing/Bablok ¹⁶	Regressione lineare
y = 0.962x + 0.248 µmol/L	y = 0.993x - 0.175 µmol/L
r = 0.971	r = 0.999

Le concentrazioni dei campioni erano comprese tra 3.03 e 47.2 µmol/L.

Letteratura

- 1 Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, et al. Homocyst(e)ine and cardiovascular disease: A critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999;131(5):363-375.
- 2 Scott J, Weir D. Homocysteine and cardiovascular disease. *Q J Med* 1996;89(8):561-563.
- 3 Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, et al. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997;337(4):230-236.
- 4 Seshadri S, Beiser A, Selhub J, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002;346(7):476-483.
- 5 Stanger O, Fowler B, Piertz K, et al. Homocysteine, folate and vitamin B12 in neuropsychiatric diseases: review and treatment recommendations. *Expert Rev Neurother* 2009;9(9):1393-1412.
- 6 McLean RR, Jacques PF, Selhub J, et al. Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons. *N Engl J Med* 2004;350(20):2042-2049.
- 7 Refsum H. Total Homocysteine: Guidelines for Determination in the Clinical Laboratory. *Clin Lab News* 2002 May;12-14 (www.aacc.org).
- 8 Refsum H, Smith AD, Ueland PM, et al. Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion. *Clin Chem* 2004;50(1):3-32.
- 9 Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, et al. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993 Feb;39(2):263-271.
- 10 Rasmussen K and Moller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem* 2000;37:627-648.
- 11 Glick MR, Ryder KW, Jackson SA. Graphical Comparisons of Interferences in Clinical Chemistry Instrumentation. *Clin Chem* 1986;32:470-475.
- 12 Breuer J. Report on the Symposium "Drug effects in Clinical Chemistry Methods". *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1996;34:385-386.
- 13 Sonntag O, Scholer A. Drug interference in clinical chemistry: recommendation of drugs and their concentrations to be used in drug interference studies. *Ann Clin Biochem* 2001;38:376-385.
- 14 Loehrer FM, Angst CP, Brunner FP, et al. Evidence for disturbed S-adenosylmethionine: S-adenosylhomocysteine ratio in patients with end-stage renal failure: a cause for disturbed methylation reactions? *Nephrol Dial Transplant* 1998;13(3):656-661.
- 15 Bakker AJ, Mücke M. Gammopathy interference in clinical chemistry assays: mechanisms, detection and prevention. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(9):1240-1243.
- 16 Bablok W, Passing H, Bender R, et al. A general regression procedure for method transformation. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part III. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988 Nov;26(11):783-790.

In questa metodica, per separare la parte intera da quella frazionaria in un numero decimale si usa sempre il punto. Il separatore delle migliaia non è utilizzato.

Simboli

Oltre a quelli indicati nello standard ISO 15223-1, Roche Diagnostics impiega i seguenti simboli (per gli USA: per la definizione dei simboli impiegati, vedere dialog.roche.com):

CONTENT	Contenuto della confezione
→	Volume dopo ricostituzione o mescolamento
GTIN	Global Trade Item Number

Le aggiunte, cancellazioni o modifiche sono indicate mediante una linea verticale posizionata al margine.

© 2019, Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim
www.roche.com

