

OMOCISTEINA PLASMATICA IN FLUORIMETRIA FAST – Codice Z09610

INTRODUZIONE

L'Omocisteina (HCY) è un aminoacido solforato prodotto dalla demetilazione della **Metionina** (fig. 1).

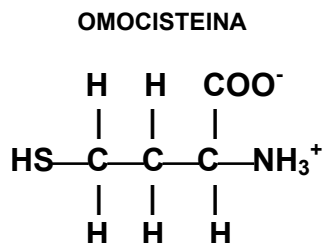


Fig. 1 : 2-Amino-4-Mercaptobutyric acid

L'HCY non partecipa alla sintesi proteica e si trova nel plasma soprattutto sotto forma di disolfuri misti quali **HCY-HCY (Omocistina)** e **HCY-Cisteina**, sia liberi che legati alle proteine.

BIOCHIMICA

La **Metionina** proveniente dall'alimentazione viene convertita in **S-AdenosilMetionina** e successivamente in **S-AdenosilOmocisteina** la quale a sua volta viene idrolizzata a omocisteina (HCY).

L'HCY a questo punto può seguire due strade metaboliche diverse:

1. L'Omocisteina può essere ri-metilata a **Metionina** ad opera dell'enzima **5-10-Metilen-Tetraidro- FolatoReduttasi (5-10-Metil-THF)** in presenza di **Vitamina B₁₂** come cofattore e di **N-Metil-Tetraidrofolato** come donatore di gruppi metilici (-CH₃).
2. L'Omocisteina legandosi alla **Serina** può essere convertita prima in **Cistationina** e poi in **Cisteina** ad opera dell'enzima **Cistationina-β-Sintetasi** in presenza di **Vitamina B₆**.

Quando una delle due vie è impedita per deficit totale del sistema enzimatico si ha l'accumulo di **omocisteina** e due possono essere le situazioni di aumento delle concentrazioni plasmatiche di **HCY**:

- Soggetto affetto **da deficit totale** di una delle due vie (condizione **OMOZIGOTE**);
- Soggetto affetto **da deficit parziale** di una delle due vie (condizione **ETEROZIGOTE**).

La **iperOmocisteinemia** grave, **da deficit totale**, (condizione **OMOZIGOTE**) determina grandi accumuli di **HCY** ed è caratterizzata clinicamente da alterazioni oculari, scheletriche, vascolari e del sistema nervoso centrale.

La lussazione del cristallino e il ritardo mentale sono caratteristiche dell'iperomocisteinemia grave.

EUREKA srl – LAB DIVISION
VAT N° 01547310423
E-mail: info@eurekaone.com
www.eurekaone.com



Head Quarter:
Via Enrico Fermi 25
60033 Chiaravalle (AN) ITALY
Tel. +39 071 7450790
Fax + 39 071 7496579



L'incidenza di questa patologia è, secondo alcuni autori, 1:200.000 della popolazione generale. In questi pazienti vi è un marcato incremento dei livelli plasmatici di HCY (fino a oltre 400 $\mu\text{M/l}$) e a questo si associano **malattie cardiovascolari su base aterosclerotica ad insorgenza precoce e manifestazioni trombotiche sia arteriose che venose**; infatti nel 1985 Mudd et al. hanno pubblicato i risultati di una survey internazionale sulle manifestazioni cliniche e sulla evoluzione naturale della malattia in 629 pazienti affetti da iper-HCY da deficit di cistationina- β -sintetasi.

Complicanze tromboemboliche erano presenti in 158 pazienti (25%), per un numero totale di 253 eventi trombotici così suddivisi:

- 51% : trombosi venose degli arti (complicate da embolia polmonare nel 25% dei casi);
- 32% : eventi cerebrovascolari acuti;
- 11% : ostruzioni arteriose periferiche;
- 4% : infarto del miocardio.

Le malattie vascolari occlusive e trombotiche sono la causa della morte prematura dei soggetti con valori elevati di HCY plasmatica; elevate concentrazioni di HCY sono un fattore di rischio indipendente di coronaropatia precoce nell'uomo; recentemente Boushey et al. hanno calcolato che un incremento di 5 $\mu\text{mol/l}$ dell'HCY aumenta il rischio di coronaropatia come un aumento di 20 mg/dl di colesterolemia.

La iperOmocisteinemia lieve da deficit parziale (condizione ETEROZIGOTE) determina, in condizione di digiuno, un lieve aumento delle concentrazioni plasmatiche di HCY; tali concentrazioni però aumentano notevolmente quando si introducono (con la dieta o con farmaci) quote anche normali di Metionina perché questa viene trasformata in HCY.

La sua trasformazione secondo le due vie sopra descritte viene rallentata e pertanto si assisterà ad un temporaneo e consistente aumento delle concentrazioni plasmatiche di HCY. Tale condizione simula una **iperOmocisteinemia grave** e quindi in un lasso di tempo più o meno lungo il soggetto è sottoposto ad un rilevante aumento del rischio di malattie vascolari.

L'iperOmocisteimemia moderata da deficit parziale è un fenomeno subdolo, potenzialmente pericoloso e notevolmente diffuso nella popolazione, **essendo riscontrabile nel 5-7% della popolazione generale** e viene anch'esso classificato come fattore di rischio indipendente di malattie vascolari.

Poiché è possibile tenere sotto controllo la malattia, sia con farmaci come **Folati** , **Vitamina B₁₂** e **B₆** che con la **dieta**, una diagnosi precoce può essere decisiva per contribuire ad attenuare notevolmente il rischio di danni gravi ed irreversibili nei soggetti portatori di moderata iperOmocisteinemia.

CARATTERISTICHE DEL KIT

Principio del Metodo:

L' Omocisteina viene analizzata trattando il plasma con un opportuno riducente e derivatizzata con un reagente specifico a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo deproteinizzazione la soluzione viene direttamente iniettata in HPLC.

Recupero del Metodo : 100%

Sensibilità del Metodo : 0,2 µmol/l

Range dinamico del metodo : 0,2 – 500 µmol/l

Range di normalità nel plasma : 5 – 15 µmol/l

Contenuto della confezione :

Tutti i reagenti sono pronti all'uso, eccetto i **Reagenti A e B**, e stabili 3 anni a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione Riducente, **1 x 20 mg** (Da ricostituire con 3 ml di Reagente D – Sol. Buffer)

Reagente B – Soluzione Derivatizzante, **2 x 0,5 ml** (Ogni flacone va diluito con 1 ml di Reagente D – Sol. Buffer al momento dell'uso)

Reagente C – Soluzione Deproteinizzante, **1 x 5 ml**

Reagente D – Soluzione Buffer, **1 x 10 ml**

Reagente E – Soluzione Standard Interno, **1 x 5 ml**

Reagente F – Soluzione Test, **1 x 5 ml**

Reagente G – Calibratore liofilo, **1 x 5 ml**

Vedi **Avvertenze**

Reagente M – Fase mobile, **2 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento HPLC isocratico con loop da 50 µl.
Detector fluorimetrico $\lambda_{EX}=385 \text{ nm}$ $\lambda_{EM}=515 \text{ nm}$
Registratore di cromatogrammi

Dotazione opzionale :

Autocampionatore.
Computer gestionale

Modalità per il prelievo ematico :

Prelevare 3 ml di sangue in una provetta con anticoagulante **citrato**. Centrifugare a 4000 rpm per 5 minuti.
Separare il plasma e stoccarlo a -20 °C.
Stabile 1 mese.

PROCEDURA PREANALITICA

Ricostituzione del **Reagente A** e del **Reagente B**

- Aggiungere al **Reagente A – Sol. Riducente** 3 ml di **Reagente D – Sol. Buffer**
- Aggiungere al **Reagente B – Sol. Derivatizzante** 1 ml di **Reagente D – Sol. Buffer** (**Stabile 6 settimane a 2–8 °C**)

Preparazione della Soluzione Test a circa 100 µmoli/l

In una provetta pipettare :

- 900 µl di H₂O di grado HPLC
- 100 µl di **Reagente F – Sol. Test**

Si otterrà una soluzione test contenente circa 100 µmoli/l

In una provetta da 1,5 ml con tappo di chiusura pipettare:

- 50 µl di Sol. Test circa 100 µmoli/l
- 30 µl di **Reagente A – Sol. Riducente**
- 50 µl di **Reagente D – Sol. Buffer**
- 50 µl di **Reagente E – Standard Interno**
- 30 µl di **Reagente B – Sol. Derivatizzante**

Al vortex per 10 secondi

- Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti
- Aggiungere 50 µl di **Reagente C – Sol. Deproteinizzante**

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 10 secondi

- Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti
- Prelevare 200 µl di sovranatante limpido

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma.

Verificare che la Sol. Test abbia un tempo di ritenzione simile a quello riportato in fig. 2. Se il Test ha dato esito positivo si può procedere alla seduta analitica. Se così non fosse verificare la funzionalità del sistema analitico. **Importante :** Questa Soluzione così ottenuta non deve essere usata come calibratore

PROCEDURA ANALITICA

FASE 1 : Preparazione dei campioni

Dispensare in provetta :

	Calibratore	Campione
Reagente G – Calibratore plasmatico	50 µl	
Campione		50 µl
Reagente A – Sol. Riducente	30 µl	30 µl
Reagente D – Sol. Buffer	50 µl	50 µl
Reagente E – Standard Interno	50 µl	50 µl
Reagente B – Sol. Derivatizzante	30 µl	30 µl

Al vortex per 10 secondi

FASE 2 : Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti

FASE 3 : Deproteinizzare con 50 µl di **Reagente C** – Sol. Deproteinizzante

Attenzione: si consiglia di deproteinizzare direttamente sul Vortex per almeno 10 secondi

FASE 4 : Centrifugare a 5000 rpm per 5 minuti

FASE 5 : Prelevare 200 µl di sovrnatante limpido

N.B.: il campione così preparato è stabile 7 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 50 µl della soluzione nel cromatografo HPLC ed attendere la stampa del cromatogramma

OMOCISTEINA PLASMATICA FAST - Avvertenze

REAGENTE F : SOLUZIONE TEST

OMOCISTEINA	circa 1.000 µmoli/l
-------------	---------------------

REAGENTE G : CALIBRATORE PLASMATICO LIOFILO Lot.001

OMOCISTEINA	42,4 µmoli/l
Modalità d'uso e Ricostituzione : i Calibratori devono essere usati per calibrare il sistema HPLC. Aggiungere esattamente 5 ml di H ₂ O di grado HPLC e agitare delicatamente per 15 minuti fino a quando tutto il materiale non è dissolto.	
Conservazione e stabilità : i Calibratori sono stabili 36 mesi dalla data di preparazione se conservati a 2-8 °C. Una volta ricostituiti almeno 12 ore a temperatura ambiente, 7 giorni se conservati a 2-8 °C e 1 mese a -20 °C. Non usarli dopo la data di scadenza.	
Confezionamento : 1 x 5 ml	
Precauzioni : il plasma umano usato per la costruzione di questi Calibratori è esente da virus dell'epatite B e HIV. In ogni caso va considerato come potenzialmente infettivo e trattato con cura.	

PARAMETRI DEL DETECTOR FLUORIMETRICO

λ _{EX}	385 nm
λ _{EM}	515 nm
GAIN	1 x 100
TEMPO DI INTEGRAZIONE	5 secondi

PROTEZIONE DELLA COLONNA ANALITICA

Per salvaguardare la colonna analitica Reverse Phase PURSUIT XRs C18 (50 x 4,6 mm, 3 µ) è tassativo l'uso della Guard Column Cartridge Holder/CARTUCCIA PRECOLONNA, cod. ZUCC270 e dei PREFILTRI per CARTUCCIA PRECOLONNA (1 x 10 pz) cod. ZUCC752.

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica nuova Reverse Phase PURSUIT XRs C18 (50 x 4,6 mm, 3 µ). Disconnettere il detector e far passare 30 ml di una soluzione di H₂O : Metanolo (20 : 80 v/v) e successivamente 30 ml di H₂O per HPLC, al flusso di 2,2 ml/minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Filtrare la fase mobile con pompa da vuoto e filtro idoneo da 0,22 µ o 0,45 µ. Condizionare la colonna con la Fase Mobile al flusso di 2,2 ml/minuto e scaricare i primi 30 ml. Condizionare ulteriormente per 30 minuti anche a ricircolo di fase. **E' possibile effettuare analisi a ricircolo di fase, purchè si abbia l'accortezza di filtrare la stessa Fase Mobile con filtro da 0,22 µ prima di ogni seduta analitica.** Se la T Amb del Laboratorio è > 20 °C si consiglia di conservare a 2-8 °C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Alla fine della seduta di analisi far fluire 30 ml di H₂O e scaricare. Far fluire una soluzione di Acqua : Metanolo o Acetonitrile 20:80 (v/v) per 30 minuti scaricandola. La colonna è di nuovo pronta per la successiva seduta di analisi.

PARAMETRI HPLC

LOOP	50 µl
Flusso di lavoro consigliato	2,2 ml/minuto
Pressione corrispondente	Circa 100 bar

PARAMETRI INTEGRATORE HP – 3394 / 3395 / 3396

ATTENUAZIONE	5
--------------	---

PARAMETRI COMPUTER GESTIONALE

SECONDO LE SPECIFICHE DEL SOFTWARE GESTIONALE

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
Z-09016	Calibratore liofilo plasmatico per Omocisteina	4 x 5 ml
Z-09017	Controllo liofilo plasmatico per Omocisteina, Livello 1	5 x 5 ml
Z-09018	Controllo liofilo plasmatico per Omocisteina, Livello 2	5 x 5 ml
Z-09019	Controllo liofilo plasmatico per Omocisteina, Livelli 1 e 2	2 x 5 x 5 ml
ZA6001050X046	Colonna Analitica Pursuit XR _s C18 (50 x 4,6mm -3 um)	1 PZ
ZUCC270	Guard Column Cartridge Holder / Cartuccia Precolonna	1 PZ
ZUCC752	Prefiltri per cartuccia Precolonna	1 x 10 PZ



OMOCISTEINA PLASMATICA FAST
(Cromatogrammi di Riferimento)

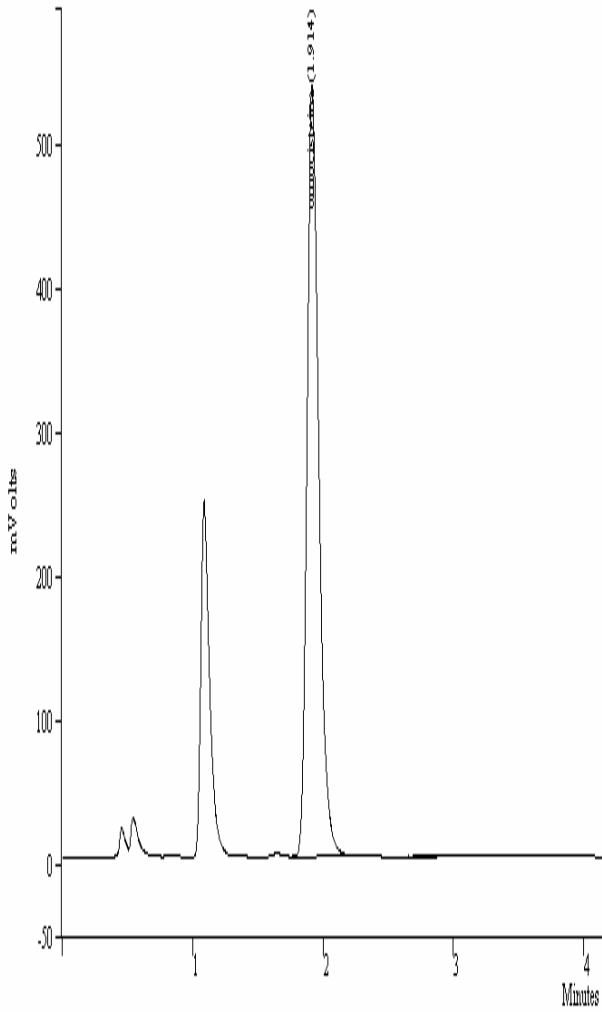


Fig. 2 :	Test
R.T. 1.91	Omocisteina

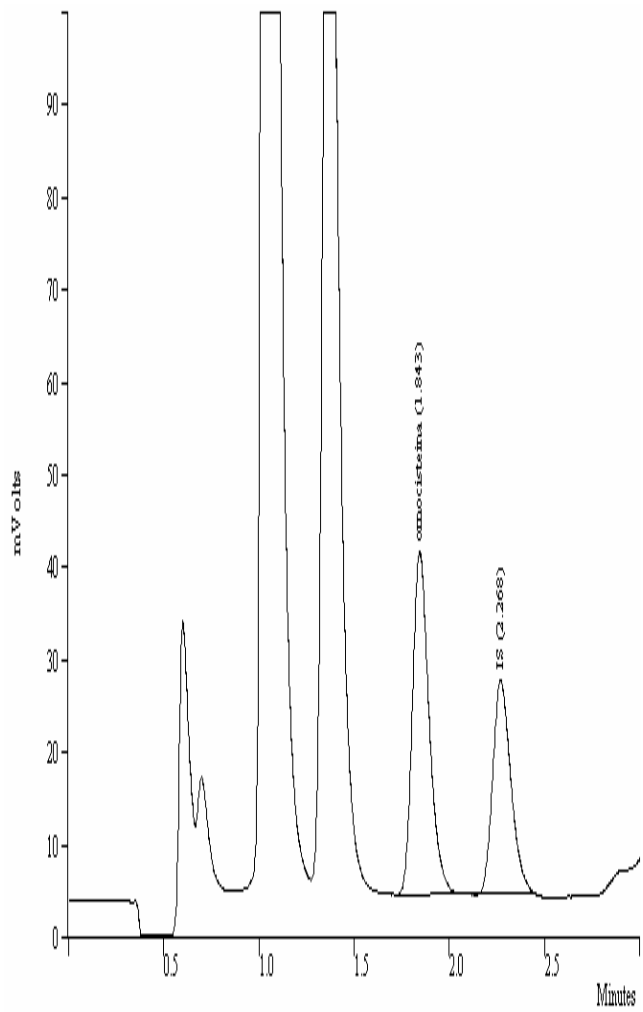


Fig. 3 :	Calibratore liofilo plasmatico
R.T. 1.84	Omocisteina 14,4 µmoli/l
R.T. 2.27	Standard Interno

OMOCISTEINA PLASMATICA FAST
(Cromatogrammi di Riferimento)

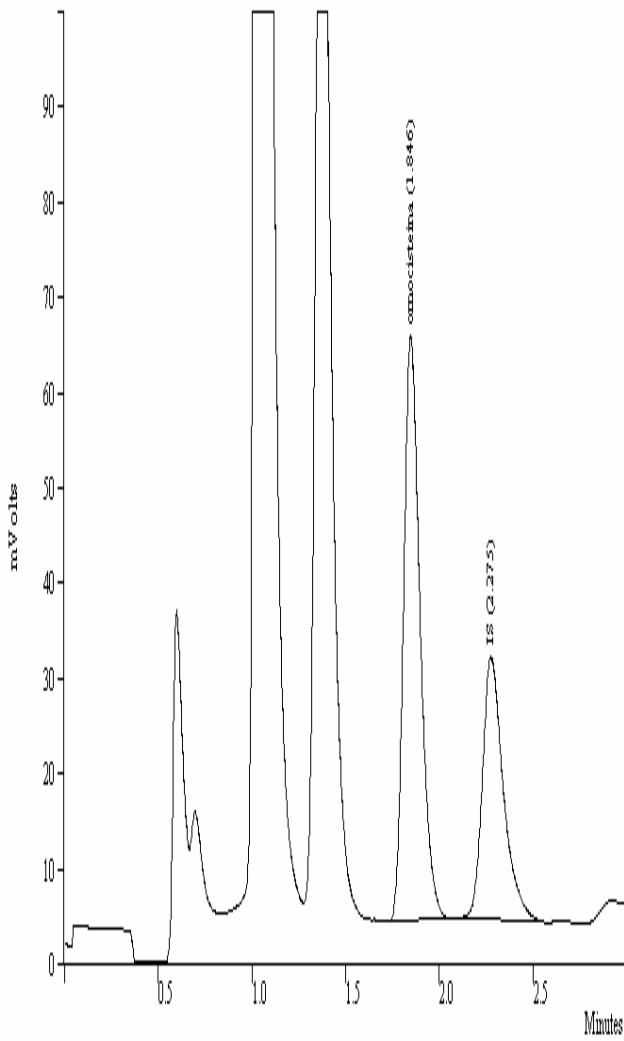


Fig. 4 :	Controllo liofilo plasmatico livello 2
R.T. 1.85	Omocisteina 23,3 $\mu\text{mol/l}$
R.T. 2.28	Standard Interno

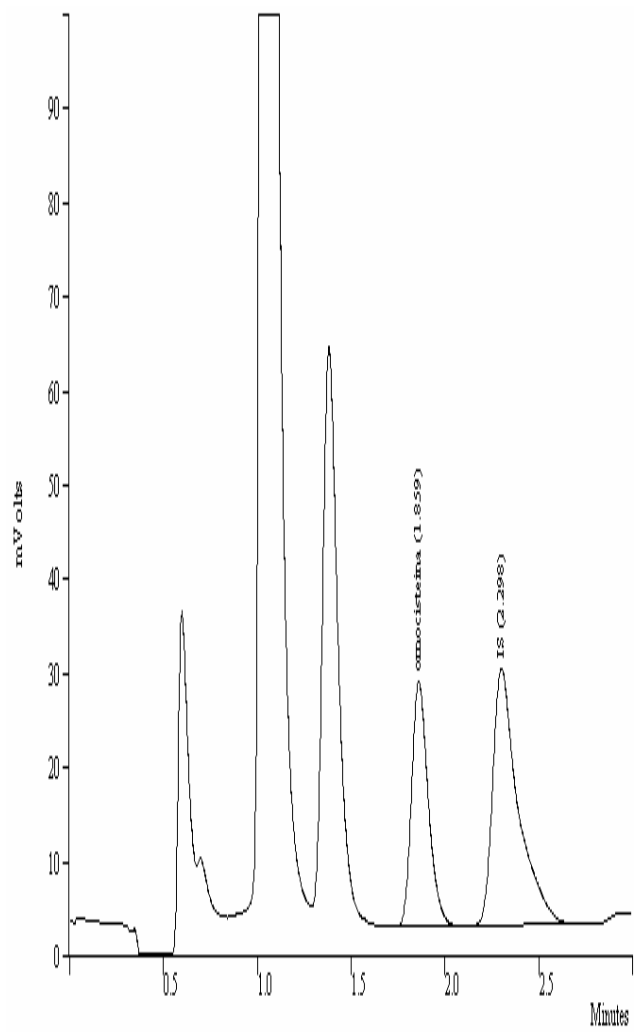


Fig. 5 :	Campione plasmatico
R.T. 1.86	Omocisteina 8,1 $\mu\text{mol/l}$
R.T. 2.29	Standard Interno