

OMOCISTEINA PLASMATICA in LC/MS – Codice LC09015

INTRODUZIONE

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

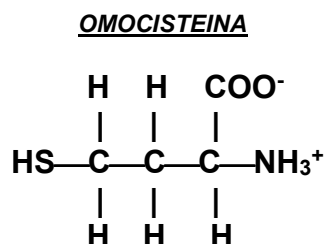


Fig. 1 : 2-Amino-4-Mercaptobutyric acid

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



Questo prodotto adempie a tutte le esigenze della Direttiva 98/79/CE sui dispositivi medico-diagnostici in vitro (IVD). La dichiarazione di conformità CE è disponibile su richiesta.

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 $\mu\text{mol/litro}$ 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.

Il presente metodo permette di analizzare l'omocisteina plasmatica mediante LC/MS/MS.

CARATTERISTICHE DEL METODO

Principio del Metodo:

L' Omocisteina viene analizzata trattando il plasma con un opportuno riducente. Dopo deproteinizzazione la soluzione viene direttamente iniettata in LC/MS.

Recupero :

>98 %

Sensibilità del Metodo (LLOD) :

1 µmol/l

Minima concentrazione analizzabile (LLOQ):

0,7 µmol/l

Linearità:

1 - 1007,46 µmol/l

Range terapeutico nel siero :

5 – 15 µmol/l

Accuratezza intra serie (errore relativo %) :

Ci	Cs	
14,5 µmol/l	32,5 µmol/l	
4,9%	1,0%	

Accuratezza inter serie (errore relativo %) :

Ci	Cs	
14,5 µmol/l	32,5 µmol/l	
6,8%	4,6%	

Riproducibilità intra serie (errore relativo %) :

C LLOQ	Cm	Cs	
7,5 µmol/l	17,5 µmol/l	37,5 µmol/l	
2,4%	3,4%	2,6%	

Riproducibilità inter serie (coefficiente di variazione %) :

C LLOQ	Cm	Cs	
7,5 µmol/l	17,5 µmol/l	37,5 µmol/l	
4,1%	3,6%	3,1%	

Coefficiente di Correlazione + DS:

0,9863 + 0,0014

Contenuto della confezione (500 tests):

Tutti i reagenti sono pronti all'uso e stabili 3 anni a 2–8 °C.

Reagente A – Soluzione Riducente, **3 x 385 mg**

Reagente B – Soluzione Buffer, **1 x 15 ml**

Reagente C – Soluzione Standard interno, **5 x 2 ml**

Conservare a – 20 °C

Reagente D – Soluzione Deproteinizzante, **1 x 100 ml**

Calibratore plasmatico – Livello 1, 3 x 1 ml

Codice LC09016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Calibratore plasmatico – Livello 2, 3 x 1 ml

Codice LC09016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Calibratore plasmatico – Livello 3, 3 x 1 ml

Codice LC09016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Calibratore plasmatico – Livello 4, 3 x 1 ml

Codice LC09016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Calibratore plasmatico – Livello 5, 3 x 1 ml

Codice LC09016 Confezionato a parte – vedi scheda tecnica

Reagente F – Soluzione Stabilizzante, **1 x 50 ml**

Reagente M1 – Fase Mobile M1, **3 x 500 ml**

Reagente M2 – Fase Mobile M2, **5 x 500 ml**

Dotazione strumentale minima richiesta :

Strumento LC-MS triplo quadrupolo
Modalità di lavoro MRM, ESI positivo
Computer gestionale

Dotazione opzionale :

Autocampionatore

Modalità per il prelievo ematico :

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

PROCEDURA ANALITICA

Ricostituzione del **Reagente A**

- Aggiungere al **Reagente A – Sol. Riducente** 5 ml di **Reagente B – Sol. Buffer**

Stabile 2 giorni a 2-8 °C

FASE 1 :

In eppendorf dispensare in sequenza.

	Calibratore – Livello 1	Calibratore – Livello 2	Calibratore – Livello 3	Calibratore – Livello 4	Calibratore – Livello 5	Campione	Controlli
Calibratore – Livello 1	100 µl						
Calibratore – Livello 2		100 µl					
Calibratore – Livello 3			100 µl				
Calibratore – Livello 4				100 µl			
Calibratore – Livello 5					100 µl		
Campione						100 µl	
Controlli							100 µl
Reagente C – Soluzione Std Interno	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Reagente A – Soluzione Riducente (dopo ricostituzione)	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Al vortex per 20 secondi

FASE 2: Far riposare a temperatura ambiente (>20°C) per 15 minuti.

FASE 3: Aggiungere 200 µl di **Reagente D – Soluzione Deproteinizzante** **direttamente sul vortex per 20 secondi**

FASE 4: Centrifugare a 14.000 giri per 10 minuti.

FASE 5: Prendere 30 µl di surnatante e aggiungere 70 µl di **Reagente F – Soluzione Stabilizzante**

Al vortex per 20 secondi

N.B.: il campione così preparato è stabile 3 giorni a 2-8 °C

INIEZIONE :

- Iniettare 10 µl della soluzione nel sistema LC

Release N° 004	Omocisteina plasmatica in LC/MS	Ottobre 2015
-----------------------	--	---------------------

OMOCISTEINA PLASMATICA - Avvertenze

CONDIZIONAMENTO DELLA COLONNA

Installare la colonna analitica *nuova* SUPELCOSIL LC-CN (33 x 4.6mm, 3um). Disconnettere il detector e far passare una soluzione di Acetonitrile : Acqua (95 : 5) per 15 minuti al flusso di 800 ul / minuto. **Non riciclare i liquidi di lavaggio.** Condizionare la colonna con la una soluzione di Fase Mobile M2 : Acqua (60 : 40) al flusso di 800 ul / minuto per 15 minuti e scaricare i primi 3 ml.

NON è possibile effettuare analisi a ricircolo di fase.

Se la T Amb del Laboratorio è > 25°C si consiglia di conservare a 2-8°C la Fase Mobile fra una seduta analitica e l'altra.

PULIZIA DELLA COLONNA

Lavare la colonna con la una soluzione di Fase Mobile M2 : Acqua (95 : 5) al flusso di 600 ul / minuto per 15 minuti. Stoccare la colonna in una soluzione di Fase Mobile M2 : Acqua (95 : 5).

LAVAGGIO SIRINGA AUTOCAMPIONATORE

Lavare la siringa, prima di ogni seduta analitica, con Metanolo. Lavaggio dell'ago dell'autocampionatore intra - serie con Metanolo.

SETTAGGIO DEI FLUSSI

GRADIENTE			
Tempo (min)	% M1 (POMPA A)	% M2 (POMPA B)	Flusso (µl/min)
0	40	60	800
2.00	40	60	800

ANALITA	PARENT ION
Omocisteina	136.0
Omocistina-D8 (Standard interno)	140.0

ACCESSORI E CONSUMABILI

CODICE	DESCRIZIONE	CONFEZIONE
LC09016	Calibratore sierico per Omocisteina	5 x 2 x 1 ml
LC09017	Controllo sierico per Omocisteina – Livello 1	5 x 1 ml
LC09018	Controllo sierico per Omocisteina – Livello 2	5 x 1 ml
LC09019	Controllo sierico per Omocisteina – Livelli 1 e 2	2 x 5 x 1 ml
Z51843550	Vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
Z51820717	Tappi per vial di vetro a volume ridotto da 1,5 ml a 15 ul	1 x 100 PZ
Z58979	Colonna analitica SUPELCOSIL LC-CN (33 x 4.6mm, 3um)	1 Pz
SK09010	Starter kit per Omocisteina	1 Pz



OMOCISTEINA PLASMATICA

(Cromatogrammi di Riferimento)

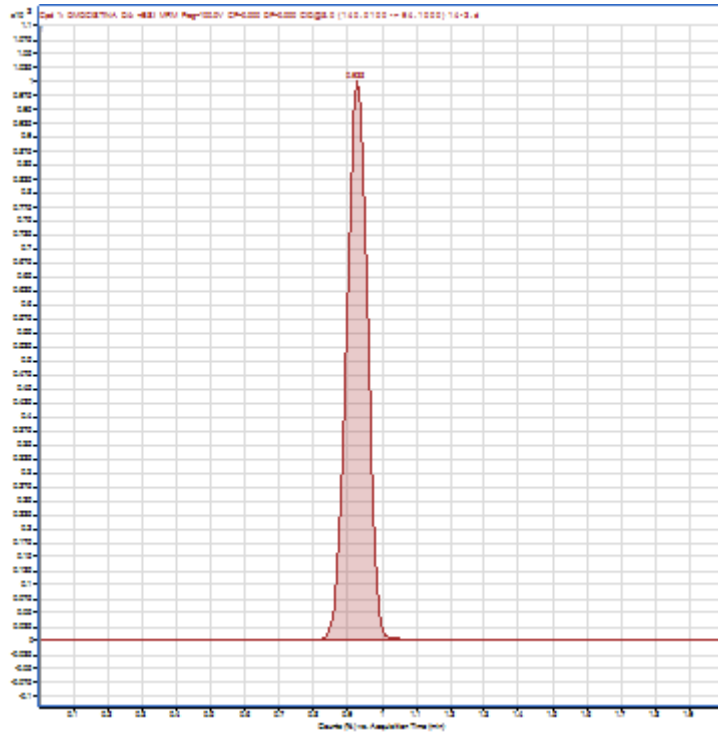


Fig. 1 : Calibratore liofilo Livello 1
R.T. IS

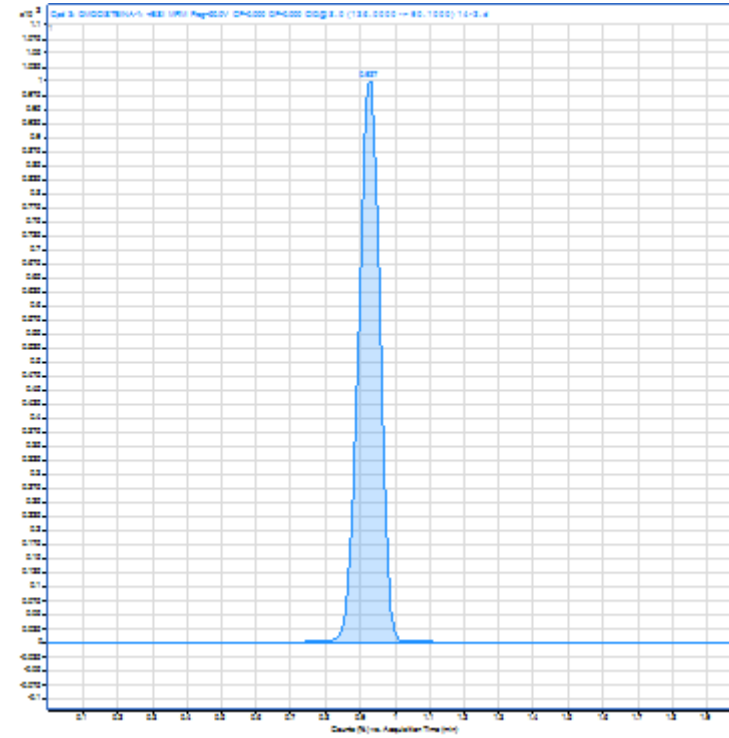


Fig. 2 : Calibratore liofilo
R.T. Omocisteina 7 umoli/L

OMOCISTEINA PLASMATICA

(Cromatogrammi di Riferimento)

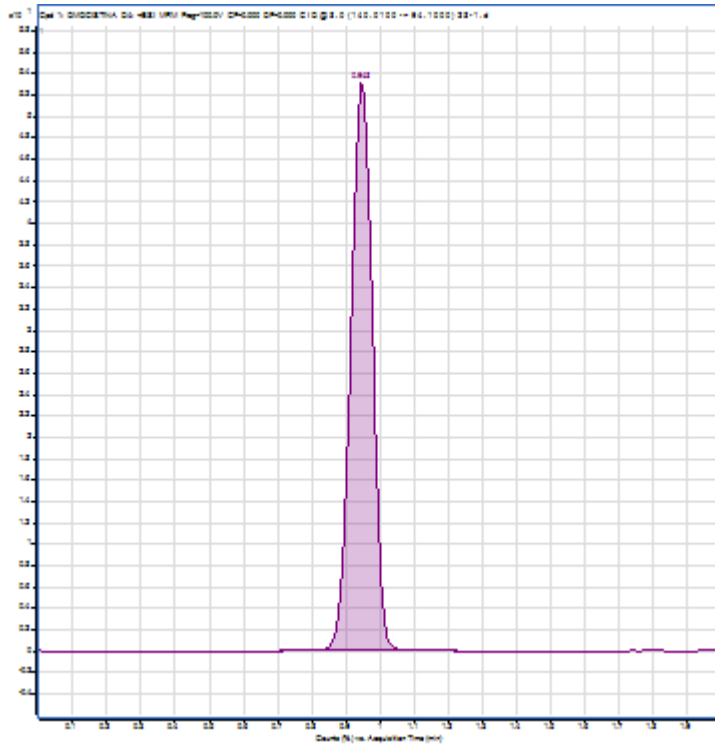


Fig. 3 : Calibratore liofilo Livello 3
R.T. IS

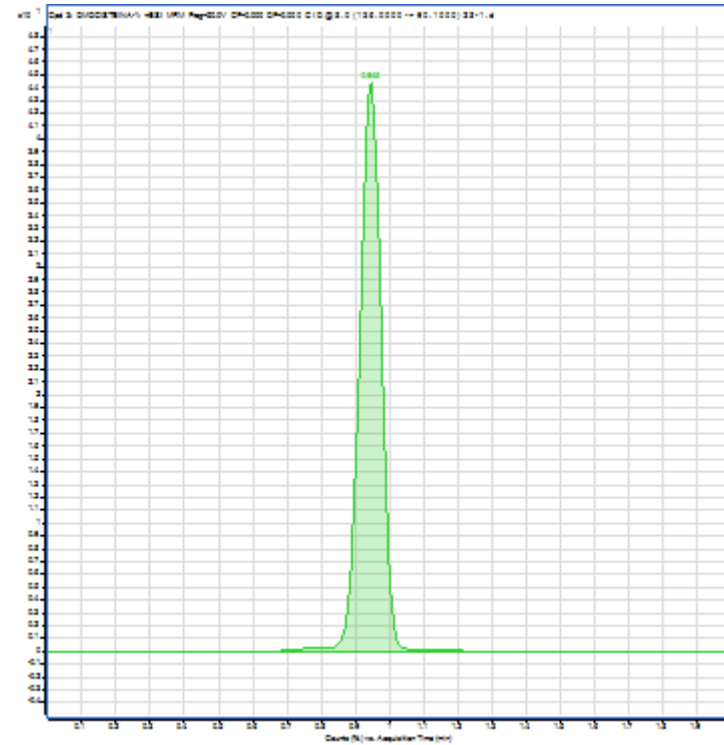


Fig. 4 : Calibratore liofilo
R.T. Omocisteina 18 umoli/L