

OMOCISTEINA SL

Metodo enzimatico bireagente

REF. 5540	2x15 + 2x2 ml + Cal 2x1ml
REF. 5539	15 + 2 ml + Cal 2x1ml
REF. 5543	2x15 + 2x2 ml (senza Cal)
REF. 5538	15 + 2 ml (senza Cal)



AZIENDA CERTIFICATA DNV
UNI EN ISO 9001:2008
UNI EN ISO 13485:2012



SIGNIFICATO CLINICO

L'omocisteina (HCY) è un aminoacido, contenente tiolo, prodotto della demetilazione intracellulare della metionina. L'omocisteina viene liberata nel plasma, dove circola prevalentemente nella sua forma ossidata legata alle proteine del plasma sotto forma di disolfuro misto di HCY proteica con albumina (SS-HCY proteico). Sono presenti piccole quantità di omocisteina ridotta e omocisteina disolfuro (HCY-SS-HCY). L'omocisteina totale (tHCY) rappresenta la somma di tutte le forme plasmatiche e seriche di HCY (libere e legate alle proteine). L'omocisteina può essere metabolizzata a cisteina o a metionina. Nella via della transulfurazione dipendente dalla vitamina B6, l'omocisteina è catabolizzata in modo irreversibile a cisteina. La maggior parte dell'omocisteina viene di nuovo metilata a metionina, principalmente ad opera dell'enzima metionin-sintasi, dipendente da folati e cobalamina. Quando queste reazioni sono carenti, si verifica un accumulo di omocisteina che viene poi secreta nel sangue. Elevate concentrazioni di omocisteina si riscontrano nei soggetti affetti da omocistinuria, una rara patologia genetica che interessa gli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'omocisteina. I pazienti affetti da omocistinuria mostrano ritardo mentale, arteriosclerosi precoce e tromboembolia arteriosa e venosa. Si riscontrano anche altre anomalie genetiche meno gravi che portano a livelli di omocisteina totale moderatamente elevati. I pazienti con patologie renali croniche presentano una maggiore morbilità e mortalità a causa di CVD arteriosclerotiche. Spesso nel sangue di questi pazienti si riscontra una concentrazione elevata di omocisteina. Sebbene questi pazienti siano carenti di alcune delle vitamine coinvolte nel metabolismo dell'omocisteina, i livelli elevati di HCY sono dovuti principalmente alla mancata rimozione dell'HCY dal sangue da parte dei reni. Alcune prove recenti hanno anche trovato un'implicazione degli alti livelli ematici di omocisteina in casi di aborto e difetti neonatali.

PRINCIPIO

L'omocisteina legata o dimerizzata (forma ossidata) è ridotta ad omocisteina libera, che poi reagisce con la serina catalizzata dalla cistationina beta-sintasi (CBS) formando cistationina. La cistationina a sua volta viene scomposta dalla cistationina beta-liasi (CBL) formando omocisteina, piruvato e ammoniaca. Il piruvato è poi convertito dalla lattato deidrogenasi (LDH) in lattato con nicotinamide adenina dinucleotide (NADH) come coenzima.

Il tasso di conversione della NADH in NAD⁺ è direttamente proporzionale alla concentrazione di omocisteina (ΔA 340 nm).

Riduzione: L'omocisteina dimerizzata, il disolfuro misto e le forme di HCY legate alle proteine presenti nel campione vengono ridotti per formare HCY libera con l'impiego di tris [2-carbossietil] fosfina (TCEP)

Conversione enzimatica: L'HCY libera viene convertita in cistationina ad opera della cistationina beta-sintasi e dalla serina in eccesso.

La cistationina viene poi scomposta in omocisteina, piruvato e ammoniaca. Il piruvato viene convertito in lattato ad opera della lattato deidrogenasi con NADH come coenzima. Il tasso di conversione della NADH in NAD⁺ (ΔA 340 nm) è direttamente proporzionale alla concentrazione di omocisteina.

CAMPIONE

Per la misurazione dell'omocisteina si può utilizzare siero (raccolto in provette per siero o con separatore di siero) e plasma (raccolto in provette con potassio EDTA o litio eparina). Non si consiglia, tuttavia, di utilizzare i singoli risultati dei pazienti ottenuti da siero, plasma eparinizzato e plasma in EDTA in modo intercambiabile. Inoltre, sono state riferite differenze di matrice fra le provette di siero e con separatore di siero e le provette di plasma. Per minimizzare l'aumentata concentrazione di omocisteina derivante dalla sintesi ad opera dei globuli rossi, preparare i campioni come segue:

- Mettere su ghiaccio tutti i campioni (siero e plasma) dopo il prelievo e prima dell'analisi. Il siero può coagulare più lentamente e il volume può ridursi.

- Tutti i campioni possono essere tenuti su ghiaccio per un massimo di 6 ore prima della separazione per centrifugazione.

- Separare i globuli rossi dal siero o plasma mediante centrifugazione e trasferirli in una provetta o altro contenitore pulito.

Nota: I campioni non messi immediatamente su ghiaccio possono presentare un aumento del 10-20% della concentrazione di HCY.

2. Se il dosaggio sarà eseguito entro 2 settimane dal prelievo, il campione deve essere conservato a 2-8°C. Se il dosaggio sarà eseguito dopo più di 2 settimane dal prelievo, il campione deve essere conservato congelato almeno a -20°C.

È dimostrato che i campioni conservati a -20°C si mantengono stabili per 8 mesi.

Giesse Diagnostics srl

Via Enrico Fermi, 3 - Z.I. V. Tiburtina Km 18.300 - 00012 Guidonia Montecelio (RM)

Tel. +39 0774 051100 - Fax +39 0774 051111

e-mail: info@giessediagnostics.com - web site: www.giessediagnostics.com

- È responsabilità dell'operatore verificare che si usino tipologie corrette di campione con il reagente Omocisteina SL.
- Eliminare l'eventuale presenza di bolle d'aria in tutti i campioni prima dell'analisi (campioni prelevati, calibratori e controlli).
- Si raccomanda di non utilizzare per questo dosaggio campioni contenenti particelle di materiale (fibrina, globuli rossi o altro materiale) tanto meno campioni visibilmente lipemici. I risultati di questi campioni possono essere imprecisi.
- Miscelare **accuratamente** i campioni dopo lo scongelamento mediante vortex a bassa velocità o capovolgendoli delicatamente per garantire risultati coerenti. Evitare la ripetizione di fasi di congelamento e scongelamento. Centrifugare prima dei test i campioni in cui sono presenti particelle, eritrociti o torbidità.
- Conservazione a bordo dello strumento. I campioni possono essere conservati per 3 ore a bordo dello strumento.

COMPONENTI FORNITI

R.(A). Liquido incolore e inodore 2x15 mL (Ref. 5540) o 1x15 mL (Ref. 5539) in flaconcino ambra NADH (0,47 mM), LDH (38 KU/L), Serina (0,76 mM), Trizma Base 1-10 %, Trizma idrocloruro 1-10%, Sodio azide < 1%. Riducente (TCEP:2,9 mM)

Pronto per l'uso

R.(B). Liquido giallo chiaro inodore 2x2,0 mL (Ref. 5540) o 1x2 mL (Ref. 5539) in flaconcino ambra Enzimi ciclati CBS (0,748 KU/L) e CBL (16,4 KU/L) Sodio azide < 1%. **Pronto per l'uso**

CAL LEVEL I Liquido incolore e inodore 1x1,0 mL in flaconcino. Blank acquoso di omocisteina (0 µmol/L). **Pronto per l'uso**

CAL LEVEL II. Liquido incolore e inodore 1x1,0 mL in flaconcino. Soluzione di omocisteina (28 µmol/L). **Pronto per l'uso**

I calibratori sono preparati con modalità gravimetrica e sono tracciabili a norma NIST SRM 1955, con conferma mediante una procedura di misurazione designata (HPLC). I valori assegnati sono stampati sulle etichette (0 µmol/L e 28 µmol/L).

INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Intervallo di riferimento: Ogni laboratorio deve determinare un intervallo di valori di riferimento corrispondente alle caratteristiche della popolazione esaminata. Finché il laboratorio non abbia analizzato un numero di campioni sufficiente a determinare tale intervallo di riferimento, è possibile utilizzare i dati di seguito indicati. Nei soggetti sani, la concentrazione plasmatica o serica di HCY varia in base a età, sesso, area geografica o fattori genetici. Per i soggetti adulti, uomini e donne, la letteratura riporta valori di riferimento fra **5 e 15 µmol/L**; vengono riportati valori più alti per gli uomini rispetto alle donne, mentre le donne che hanno superato la menopausa hanno valori di omocisteina più alti rispetto a quelle in età pre-menopausa.

Di norma, i valori di HCY aumentano con l'età, indicando per i soggetti anziani (> 60 anni) un intervallo di valori di riferimento di 5-20 µmol/L. Nei paesi che attuano programmi di rafforzamento dell'acido folico si osservano livelli di HCY più bassi.

Intervallo misurabile: L'intervallo misurabile nell'analisi della Omocisteina con il kit 5540 (o 5539) è di 1-46 µmol/L.

SMALTIMENTO

Applicare le norme di cui al D.Leg.vo 22/97 e successive modificazioni (Rifiuti Speciali e Pericolosi con relativo codice CER).

STABILITÀ E CONSERVAZIONE

I reagenti e i calibratori devono essere conservati a 2-8°C. NON CONGELARE. I reagenti e i calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta, se conservati secondo le istruzioni. Non miscelare reagenti di lotti diversi.

I reagenti e i calibratori sono liquidi pronti all'uso.

PROCEDIMENTO

Lunghezza d'onda	340 nm
Cammino ottico	1 cm
Temperatura	37 °C
Letture	contro bianco reattivo
Reazione	Fixed time
Calibrazione	Multipunti

	Bianco	Campione	Calibratore
Reagente (A)	280 µl	280 µl	280 µl
Acqua	20 µl		
Campione		20 µl	
Calibratori (1-2)			20 µl
Agitare e incubare per 4 minuti			
Reagente (B)	28 µl	28 µl	28 µl

Agitare e trasferire in cuvetta e, dopo incubazione di 1 minuto a 37 ° (T.0'), leggere l'estinzione dei calibratori e dei campioni al tempo 0" e dopo 220". Calcolare il $\Delta E/\text{min}$ a 340 nm.

• Stabilità della Calibrazione

Su OLYMPUS AU400 la curva di calibrazione è stabile per 30 giorni.

PRESTAZIONI DEL METODO

È stato svolto uno studio di correlazioni con campioni di plasma prelevati da adulti apparentemente sani. Tutti i campioni sono stati analizzati con il Kit Omocisteina LS secondo il documento EP9-A2 CLSI (ex NCCLS). Tutti i risultati sono basati su un intervallo di confidenza del 95%. I campioni analizzati con il kit omocisteina SL hanno dato risultati fra 6.5 e 49.0 $\mu\text{mol/L}$. I dati ottenuti hanno fornito i seguenti valori statistici

Metodo di confronto: Numero di campioni 94-Pendenza della curva di regressione 0,991-Intercetta Y 0,165-Coefficiente di correlazione 1,0

Precisione

È stato svolto uno studio sulla scorta del documento EP5-A2 CLSI (ex NCCLS). Sono stati analizzati tre controlli HCY e tre profili di plasma umano con due lotti di reagenti, con due ripetizioni, in due momenti separati ogni giorno per 20 giorni su un unico strumento (n=80). All'inizio dello studio è stata generata una curva di calibrazione, poi usata per tutto il corso dello studio stesso.

Linearità di campioni diluiti

La linearità di campioni diluiti con il kit di Omocisteina SL dà per tutti i campioni una percentuale di recupero del 91-104 % su tutto l'intervallo del dosaggio (1-46 $\mu\text{mol/L}$) sul OLYMPUS AU400.

I campioni > 46 $\mu\text{mol/L}$ presentano un recupero medio del 100% + 11% del risultato previsto se diluiti nell'intervallo del dosaggio.

Limite misurabile

Il limite misurabile del kit di Omocisteina SL, conforme al documento EP17-A30 CLSI (ex NCCLS) è stato individuato in 0,33 $\mu\text{mol/L}$.

Specificità analitica

La specificità del kit di Omocisteina SL è stata valutata in conformità con il documento EP7-A231 CLSI per le sostanze interferenti elencate nella tabella sottostante:

Bilirubina 20 mg/dl $\leq +10$	Glutadione 1000 $\mu\text{mol/l} \leq +10$
Emoglobina 500 mg/dl $\leq +10$	Metionina 800 $\mu\text{mol/l} \leq +10$
Globuli rossi 0.4 % $\leq +10$	Cisteina 200 $\mu\text{mol/l} \leq +10$
Trigliceridi 500 mg/dl $\leq +10$	Piruvato 1250 $\mu\text{mol/l} \leq +10$

Nessuna di queste sostanze ha prodotto interferenze significative nel dosaggio. I campioni con livelli elevati di proteine mostrano una differenza > 10% rispetto ai risultati ottenuti da campioni normali, pertanto si consiglia di evitarli.

LIMITI DEL METODO

- I campioni con un valore di Hcy superiore ai 50 $\mu\text{mol/L}$ devono essere diluiti 1:1
- Il reattivo deve essere limpido. Il reattivo deve essere scartato se diventa torbido o se l'assorbimento iniziale è inferiore a 0.5 a 340 nm.
- Il S-adenosilomocisteina (SAH) causa una significativa interferenza positiva.
- I pazienti che hanno assunto i seguenti farmaci (methorexato, carbamazepina, fenitoina, ossido nitroso, anticonvulsivanti, triacetato di 6-azauridina), possono avere livelli elevati di Hcy dovuti all'interferenza dei farmaci con il metabolismo dell'omocisteina.
- E' stato suggerito di aggiungere dell' 3-deazaadenosine per inibire la produzione di Hcy nei globuli rossi. Non è possibile l'uso di un campione contenente 3-deazaadenosine poiché questo inibisce uno degli enzimi che vengono utilizzati per la produzione di questo Kit.

CONTROLLO DI QUALITA'

E' necessario eseguire i controlli ad ogni utilizzo del kit e verificare che i valori ottenuti siano inclusi nell'intervallo di riferimento riportato nelle istruzioni d'uso.

A tale scopo si consiglia l'utilizzo dei sieri di controllo REF.5541

PRECAUZIONI E AVVERTENZE

Ogni qualvolta si manipolano agenti infettanti, reagenti chimici, reagenti di origine umana od animale, sangue o altri liquidi biologici, è consigliabile seguire le più comuni raccomandazioni e prendere tutte le necessarie precauzioni igieniche come l'utilizzazione di guanti monouso.

Precauzioni per la sicurezza

1. Attenersi scrupolosamente alle istruzioni, in particolare per le condizioni di manipolazione e conservazione.
2. Il Reagente (A) e il Reagente (B) contengono sodio azide che può reagire con le tubazioni in piombo o rame formando azidi metalliche altamente esplosive. Per lo smaltimento, diluire con acqua in grande quantità.
3. Sono reperibili su richiesta le schede di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti nel kit.

LIMITAZIONI

1. L'intervallo lineare del kit Omocisteina SL utilizzato secondo le istruzioni è di 1-46 $\mu\text{mol/L}$. I campioni > 46 $\mu\text{mol/L}$ devono essere diluiti nel rapporto di 1 parte di campione e 2 parti di Cal 0 $\mu\text{mol/L}$ o di 1 parte di campione e 9 parti di Cal 0 $\mu\text{mol/L}$, come necessario.
2. I reattivi devono essere limpidi.
3. Insieme all'omocisteina viene misurata la cistationina, ma il suo livello nella popolazione generale (tra 0,065 e 0,3 $\mu\text{mol/L}$) ha un effetto trascurabile. In alcuni casi rarissimi di patologie renali nello stadio finale e pazienti con gravi disturbi metabolici, i livelli di cistationina possono aumentare drasticamente e causare un'interferenza superiore al 20% nei casi più gravi.
4. L'idrossilamina, presente in vari reagenti per il ferro, può causare contaminazioni (la sonda del reattivo o cuvetta di reazione), fornendo così risultati erroneamente bassi. Nella maggior parte dei casi il risciacquo di routine non è sufficiente ad eliminare il problema. Fra le possibili soluzioni si indicano speciali protocolli di lavaggio. Il dosaggio del ferro che usi acido ascorbico come riducente può interferire. Si consiglia la determinazione del ferro e dell'omocisteina su strumenti separati.
5. Carbamazepina, metotrexato, fenitoina, ossido nitroso o 6-azauridina triacetato possono influire sulla concentrazione della HCY.
6. I campioni con livelli proteici aumentati presentano una differenza >10% rispetto ai risultati ottenuti da campioni normali e dovrebbero quindi essere evitati.
7. I campioni di pazienti sotto terapia con S-adenosil-metionina possono mostrare livelli di omocisteina erroneamente elevati. I pazienti che assumono metotrexato, carbamazepina, fenitoina, ossido nitroso, anticonvulsivi o 6-azauridina triacetato, possono mostrare livelli elevati di omocisteina dovuti al loro effetto sulle analisi.
8. Si raccomanda di non utilizzare per questo dosaggio campioni contenenti particelle di materiale (fibrina, globuli rossi o altro materiale) tanto meno campioni visibilmente lipemici. I risultati di questi campioni possono essere imprecisi.

BIBLIOGRAFIA

1. McCully KS. Vascular Pathology of Homocysteinemia: Implications for the Pathogenesis of Arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-122
2. Malinow MR. Plasma Homocyst(e)ine and Arterial Occlusive Diseases: A Mini-Review. *Clin Chem* 1995;41:173-176
3. Ueland PM. Homocysteine Species as Components of Plasma Redox Thiol Status. *Clin Chem* 1995;41:340-342
4. Finkelstein JD. Methionine Metabolism in Mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1:228-237
5. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of Transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., eds *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw- Hill, 1995;1279-1327
6. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-1155

HOMOCYSTEINE SL

Bireagent enzymatic method

REF. 5540	2x15 + 2x2 ml + Cal 2x1 ml
REF. 5539	15 + 2 ml + Cal 2x1 ml
REF. 5543	2x15 + 2x2 ml (without Cal)
REF. 5538	15 + 2 ml (without Cal)



DNV CERTIFIED COMPANY

UNI EN ISO 9001:2008

UN EN ISO 13485:2012



CLINICAL SIGNIFICANCE

Homocysteine (HCY) is a thiol-containing amino acid produced by the intracellular demethylation of methionine. HCY is exported into plasma where it circulates mostly in its oxidized form bound to plasma proteins as a protein-HCY mixed disulphide with albumin (SS-HCY proteic). Smaller amounts of reduced homocysteine and the disulphide homocysteine (HCY-SS-HCY) are present. Total homocysteine (tHCY) represents the sum of all HCY species found in plasma and serum (free plus protein bound). HCY is either metabolized to cysteine or to methionine. In the vitamin B6 dependent trans-sulphuration pathway HCY is irreversibly catabolized to cysteine. A major part of HCY is remethylated to methionine, mainly by the folate and cobalamin-dependent enzyme methionine synthase. HCY accumulates and is excreted into the blood when these reactions are impaired. Severely elevated concentrations of HCY are found in subjects with homocystinuria, a rare genetic disorder of the enzymes involved in the metabolism of HCY. Patients with homocystinuria exhibit mental retardation, early arteriosclerosis and arterial and venous thromboembolism. Other less severe genetic defects that lead to moderately elevated levels of HCY are also found. Patients with chronic renal disease experience an excess morbidity and mortality due to arteriosclerosis CVD. Elevated concentration of HCY is a frequently observed finding in the blood of these patients. Although such patients may lack some of the vitamins involved in the metabolism of HCY, the increased levels of HCY are mainly due to impaired removal of HCY from the blood by the kidney. Recently there have been evidence of abortions and baby disease because of an elevated concentration of HCY.

PRINCIPLE

Bound or dimerised HCY (oxidised form) is reduced to free HCY, which then reacts with serine catalysed by cystathionine beta-synthase (CBS) forming cystathionine. Cystathionine in turn is broken down by cystathionine beta-lyase (CBL) to form homocysteine, pyruvate and ammonia. Pyruvate is then converted by lactate dehydrogenase (LDH) to lactate with nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) as coenzyme.

The rate of NADH conversion to NAD⁺ is directly proportional to the concentration of homocysteine (ΔA 340 nm).

Reduction: Dimerised homocysteine, mixed disulfide, and protein-bound forms of HCY in the sample are reduced to form free HCY by the use of tris [2-carboxyethyl] phosphine (TCEP).

Enzymatic Conversion: Free HCY is converted to cystathionine by the use of cystathionine beta-synthase and excess serine. The cystathionine is then broken down to homocysteine, pyruvate and ammonia. Pyruvate is converted to lactate via lactate dehydrogenase with NADH as coenzyme. The rate of NADH conversion to NAD⁺ (ΔA 340 nm) is directly proportional to the concentration of homocysteine.

SAMPLE

Serum (collected in serum or serum separator tubes) and plasma (collected in potassium EDTA or lithium heparin tubes) may be used for the measurement of homocysteine. However, it is not recommended to use individual patient results from serum, heparinized plasma and EDTA plasma interchangeably. Additionally matrix differences between serum and serum separator tubes and plasma tubes have been reported.

To minimize increases in homocysteine concentration from synthesis by red blood cells process specimens as follows:

- Place all specimens (serum and plasma) on ice after collection and prior to processing. Serum may clot more slowly and the volume may be reduced.
- All specimens may be kept on ice for up to 6 hours prior to separation by centrifugation.
- Separate red blood cells from serum or plasma by centrifugation and transfer to a sample cup or other clean container.

Note: 1. Specimens not placed on ice immediately may exhibit a 10-20% increase in homocysteine concentration.

2. If the assay will be performed within 2 weeks after collection, the specimen should be stored at 2-8°C. If the testing will be delayed more than 2 weeks, the specimen should be stored frozen at -20°C or colder.

Specimens have been shown to be stable at -20°C for 8 months.

3. It is the responsibility of the operator to verify the correct specimen type(s) (are) used with the Homocysteine LS reagent.

4. Inspect all samples (specimens, calibrators and controls) for bubbles. Remove bubbles prior to analysis.

Giessa Diagnostics srl

Via Enrico Fermi, 3 - Z.I. V. Tiburtina Km 18.300 - 00012 Guidonia Montecelio (RM)

Tel. +39 0774 051100 - Fax +39 0774 051111

e-mail: info@giessediagnostics.com - web site: www.giessediagnostics.com

5. Specimens containing particulate matter (fibrin, red blood cells, or other matter) and visibly lipemic specimens should not be used with the assay. Results from these specimens may be inaccurate.

6. Mix specimens **thoroughly** after thawing by low speed vortexing or by gentle inversion to ensure consistency in results. Avoid repeated freezing and thawing. Specimens showing particulate matter, erythrocytes, or turbidity should be centrifuged before testing.

7. On board instrument storage. Plasma samples can be stored for 3 hours on-board the instrument.

PACKAGE

R.(A). Colourless and odourless liquid 2x15mL (Ref. 5540) or 1x15 mL (Ref. 5539) in amber vial NADH (0,47 mM), LDH (38 KU/L), Serine (0,76 mM), Trizma Base 1-10 %, Trizma hydrochloride 1-10%, Sodium azide < 1%. Reductant (TCEP:2,9 mM) **Ready to use.**

R.(B). Pale yellow odourless liquid 2x2,0 mL (Ref. 5540) or 1x2.0 mL (Ref. 5539) in amber vial. Cycling Enzymes CBS (0,748 KU/L) and CBL (16,4 KU/L) Sodium azide < 1%. **Ready to use.**

CAL LEVEL I. Colourless and odourless liquid 1x1.0 mL in vial. Aqueous Homocysteine blank (0 µmol/L). **Ready to use.**

CAL LEVEL II. Colourless and odourless liquid 1x1.0 mL in vial. Aqueous Homocysteine solution (28 µmol/L). **Ready to use.**

Calibrators are prepared gravimetrically and are traceable to NIST SRM 1955, confirmed by a designated measurement procedure (HPLC). The assigned values are printed on the labels (0 µmol/L e 28 µmol/L).

EXPECTED VALUES

Reference Range: The reference range should be determined by each laboratory to confirm the characteristics of the population being tested. As a point of reference the following data may be used until the laboratory has analysed a sufficient number of specimens to determine its own reference range. The HCY concentration in plasma or serum of healthy individuals varies with age, gender, geographical area and genetic factors. Scientific literature reports reference values for adult male and females between **5 and 15 µmol/L**, men having higher values than women, and post menopausal woman having higher homocysteine values than pre-menopausal women. HCY values will normally increase with age, giving a reference range among an elderly population (> 60 years) of 5-20 µmol/L. In countries with folic acid fortification programmes, reduced levels of HCY may be observed.

Measurable Range: The measurable range of the homocysteine assay with kit 5540 (or 5539) is 1-46 µmol/L.

WASTE DISPOSAL

Apply the rules laid down in D.Leg.vo 22/97 and subsequent amendments (Special and Hazardous Waste with relevant CER code).

STABILITY AND STORAGE

Store Reagents and calibrators at 2-8°C. **DO NOT FREEZE.** Reagents and calibrators may be used until the expiry date on the labels if stored as directed. Do not mix different reagent kit lot number. Reagents and calibrators are liquid and ready to use.

PROCEDURE

Wavelength:	340 nm
Optical path:	1 cm
Temperature:	37 °C
Reading:	against blank reagent
Reaction:	Fixed time
Calibration:	Multipunti

	Blank	Sample	Calibrator
Reagente (A)	280 µl	280 µl	280 µl
Water	20 µl		
Sample		20 µl	
Calibrators (1-2)			20 µl
Mix and incubate for 4 minutes			
Reagent (B)	28 µl	28 µl	28 µl

Shake and put in cuvette and, after the incubation time of 1 minutes at 37 ° (T.O'), read the calorimeters and sample extinction at 0" and after 220". Calculate the $\Delta E/\text{min}$ at 340 nm.

• **Stabilità della Calibrazione**

On OLYMPUS AU400 the calibration curve is stable for 30 days.

PERFORMANCE

A correlation study was performed with plasma specimens from apparently healthy adults. All specimens were analysed using the homocysteine LS kit according to the CLSI (formally NCCLS) document EP9-A2. All results are based on 95% confidence Interval. All homocysteine kits specimens ranged from 6.5 to 49.0 $\mu\text{mol/L}$. The data obtained gave the following statistical values:

Comparison Method Number of specimens 94 Slope of regression line 0.991 Y-Intercept 0.165

Correlation coefficient 1.0

Precision

A study was performed with guidance from the CLSI (formally NCCLS) Document EP5-A2.

Three HCY controls and three human plasma panels were assayed using two lots of reagents, in replicants of two, at two separate times per day for 20 days on one instrument (n=80). A calibration curve was generated at the start of the study and was used throughout.

Dilution Linearity

The dilution linearity of the specimens gives a % recovery range of 91–104% for all samples across the range of the assay (1–46 $\mu\text{mol/L}$) on the OLYMPUS AU400.

Samples > 46 $\mu\text{mol/L}$ exhibit mean recovery of 100% + 11% of the expected result when diluted into the assay range.

Limit of Detection

The limit of detection (LOD) of the homocysteine kit according to the CLSI (formally NCCLS) Document EP17-A 30 was found to be 0.33 $\mu\text{mol/L}$.

Analytical Specificity

The specificity of the homocysteine LS was assessed according to guidance in the CLSI Document EP7-A231 for the interfering substances listed in the table below:

Bilirubin 20 mg/dl $\leq +10$	Glutathione 1000 $\mu\text{mol/l} \leq +10$
Haemoglobine 500 mg/dl $\leq +10$	Methionina 800 $\mu\text{mol/l} \leq +10$
RBC 0.4 % $\leq +10$	Cysteina 200 $\mu\text{mol/l} \leq +10$
Triglycerides 500 mg/dl $\leq +10$	Pyruvate 1250 $\mu\text{mol/l} \leq +10$

None of these substances interfered significantly in the assay.

Samples with raised protein levels show > 10% difference compared to results obtained from normal samples and should be avoided.

METHOD LIMITATIONS

- Samples with a HCY value higher than 50 $\mu\text{mol/l}$ should be diluted
- The reagent should be clear. Discard if turbid or if the beginning absorption is less than 0.5 to 340 nm .
- The S-adenoyilhomocysteine (SAH) may cause a remarkable and positive interference.
- Patients who took the following drugs (methorexato, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide, anticonvulsive,6-azuridine triacetate), may have high level of Hcy caused by the interference between drugs and HCY metabolism.
- It has been suggested to add 3-deazaadenosine to inhibit the production of Hcy in the red cells. It is not possible the use of a sample containing 3 deazaadenosine as this inhibits one of the enzyme used for the production of the kit.

QUALITY CONTROL

It is recommended to execute the quality control at every kit utilization to verify that values are within the reference range indicated by the methodology. For this purpose the use of test serum REF.5541 is advised.

PRECAUTIONS AND WARNINGS

Each time infected agents, chemical reagents, human or animal reagents, blood and every kind of biological substance are handled with, it is recommended to follow the common hygienic precaution; ex: wearing gloves, etc.

Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this leaflet, particularly for handling and storage conditions.
2. Reagent A and Reagent B contain sodium azide which can react with lead or copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with large quantities of water .
3. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available upon request.

LIMITATIONS

1. The linear range of the homocysteine kit when run as directed is 1-46 $\mu\text{mol/L}$. Specimens > 46 $\mu\text{mol/L}$ should be diluted 1 part specimen to 2 parts Cal 0 $\mu\text{mol/L}$ or 1 part specimen to 9 parts Cal 0 $\mu\text{mol/L}$ as appropriate.
2. The Reagents should be clear.
3. Cystathionine is measured with homocysteine, but in the general population the cystathionine level (0.065 to 0.3 $\mu\text{mol/L}$) has a negligible effect. In very rare cases, renal disease and patients with severe metabolic disturbances, cystathionine levels may rise dramatically and in severe cases cause greater than 20% interference.
4. Hydroxylamine, present in several iron reagents may carryover (reagent probe or reaction cuvette) and cause falsely low results. Routine rinsing procedures are not adequate to eliminate this problem in most cases. Possible solutions would include special washing protocols, changing to an iron assay that used ascorbic acid as reductant or running iron and homocysteine assays on separate instruments.
5. Carbamazepine, methotrexate, phenytoin, nitrous oxide, or 6-azauridine triacetate may affect the homocysteine concentration.
6. Samples with raised protein levels show > 10% difference compared to results obtained from normal samples and should be avoided.
7. Note: Specimens from patients who are on drug therapy involving S-adenosyl-methionine may show falsely elevated levels of homocysteine. Patients who are taking methotrexate, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide, anticonvulsants, or 6-azauridine triacetate, may have elevated levels of homocysteine due to their effect on the pathway.
8. Specimens containing particulate matter (fibrin, red blood cells, or other matter) and visibly lipemic specimens should not be used with the assay. Results from these specimens may be inaccurate.

REFERENCES

1. McCully KS. Vascular Pathology of Homocysteinemia: Implications for the Pathogenesis of Arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969;56:111-122.
2. Malinow MR. Plasma Homocyst(e)ine and Arterial Occlusive Diseases: A Mini-Review. *Clin Chem* 1995;41:173-176.
3. Ueland PM. Homocysteine Species as Components of Plasma Redox Thiol Status. *Clin Chem* 1995;41:340-342.
4. Finkelstein JD. Methionine Metabolism in Mammals. *J Nutr Biochem* 1990; 1:228-237.
5. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorders of Transsulfuration. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, et al., eds *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. New York: McGraw- Hill, 1995; 1279-1327.
6. Clarke R, Daly L, Robinson K, et al. Hyperhomocysteinemia: An Independent Risk Factor for Vascular Disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-1155.