

Quantitative determination of total Homocystein (tHcy) IVD

Store at 2-8°C

INTENDED USE

The Homocystein Reagent is intended for in vitro quantitative determination of total homocystein in human serum and plasma. The device can assist in the diagnosis and treatment of patients suspected of having hyperhomocysteinemia and homocystinuria.

PRINCIPLE OF THE METHOD

Bound or dimerised homocystein (oxidised form) is reduced to free homocystein, which then reacts with serine catalysed by cystathionin beta-synthase (CBS) to form cystathionin. Cystathionin in turn is broken down by cystathionin beta-lyase (CBL) to form homocystein, 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 homocystein ($\Delta A_{340\text{ nm}}$).

CLINICAL SIGNIFICANCE

Homocystein is a thiol-containing amino acid produced by the intracellular demethylation of methionin. Total homocystein (tHcy) represents the sum of all forms of Hcy including forms of oxidized, protein bound and free.

Elevated level of tHcy has emerged as an important risk factor in the assessment of cardiovascular disease. Excess Hcy in the blood stream may cause injuries to arterial vessels due to its irritant nature, and result in inflammation and plaque formation, which may eventually cause blockage of blood flow to the heart. Elevated tHcy levels are caused by four major factors, including: a) genetic deficiencies in enzymes involved in Hcy metabolisms such as cystathionin beta-synthase (CBS), methionin synthase (MS) and methyltetrahydrofolate reductase (MTHFR); b) nutritional deficiency in B vitamins such as B6, B12 and folate; c) renal failure for effective for amino acid clearance, and d) drug interactions such as nitric oxide, methotrexate and phenytoin that interfere with Hcy metabolisms.

Elevated levels of tHcy are also linked with Alzheimer's disease and Osteoporosis

REAGENTS

R1	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)
R2	Cycling Enzymes CBS (0.748 KU/L) and CBL (16.4 KU/L) Sodium Azide < 1%.
Optional	Ref. 1002276 Calibrator 2 x 3.0 mL Ref. 1002281 Control 3 x 1.5 mL

PRECAUTIONS

R1 and R2: Xn. R22: Harmful if swallowed. R32: Contact with acids liberates very toxic gas. S36/37/39: Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection. S29/35: Do not empty into drains; dispose of this material and its container in a safe way. S46: If swallowed, seek medical advice immediately and show this container or label.

CALIBRATION

Spinreact recommends using tHcy Calibrator (Ref: 1002276). The calibrators are prepared gravimetrically and are traceable to NIST SRM 1955. It is not recommended the use of other commercially available tHcy calibrators.

STORAGE AND STABILITY

- All the kit components are stable until the expiration date on the label, when stored tightly closed at 2-8°C, protected from light and contaminations prevented during their use.
- Do not mix the reagents of different lots.
- **Do not freeze reagents.**
- Do not expose Reagent 1 and Reagent 2 to light during on-board use.
- Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.
- The reagents should be clear of particulate material. They should be discarded if they become turbid.

ADDITIONAL EQUIPMENT

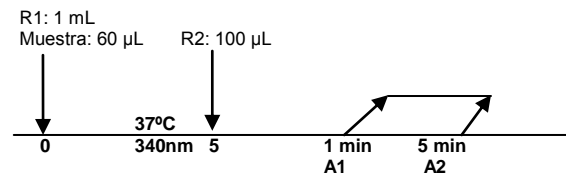
- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.

SAMPLES

- Fresh serum or heparin plasma. It is important to centrifuge blood samples immediately after collection to separate the plasma from the blood cells. If immediate centrifugation is not possible, collected blood specimens should be kept on ice and centrifuged within an hour.
- Hemolysed, turbid or lipemic specimens are not recommended.
- 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.^{1,2}
- Mix specimens thoroughly after thawing by low speed vortexing or by gentle inversion to ensure consistency in results. Avoid repeated freezing and thawing.

PROCEDURE

- All components are ready to use.



CALCULATIONS

Plot (A2- A1) obtained against the tHcy concentration of both calibrators. tHcy concentration in the sample is calculated by interpolation of its (A2- A1) in the linear calibration curve.

QUALITY CONTROL

It is recommended to validate the performance of Hcy reagents with an available set of Hcy Control (Ref. 1002281).

If control values are found outside the defined range, check the instrument, reagents and calibrator for problems.

Each laboratory should establish its own acceptable tolerances for the Control.

REFERENCE VALUES

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 homocystein values than pre-menopausal women.^{1,3,4}

These values are orientative. The reference range should be determined by each laboratory to confirm the characteristics of the population being tested.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Limit of detection: 0.33 µmol / L.

Measurement range: The linear range is 1-46 µmol/L. Specimens > 46 µmol/L should be diluted 1 part specimen to 2 parts Cal 0 µmol/L or 1 part specimen to 9 parts Cal 0 µmol/L as appropriate.

Precision:

The study was conducted according to the NCCLS EP-5 protocol. Three HCY controls were assayed, in replicates of two, at two separate times per day for 20 days on one instrument (n=80).

Level of Hcy control	Within Precision			Total Precision		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Mean (µM)	6.3	12.3	25.5	6.3	12.3	25.5
CV (%)	2.6	1.5	1.5	4.4	3.0	2.5

Accuracy: Results obtained using SPINREACT reagents (y) did not show systematic differences when compared with other commercial reagents (x).

The results obtained using 94 samples were the following:

Correlation coefficient r= 0.999.

Regression equation: y= 0.165+ 0.991x.

The results of the performance characteristics depend on the analyzer used.

INTERFERENCES

The following substances produced less than 10% deviation when tested with the following stated concentrations: bilirubin 20 mg/dL, haemoglobin 500 mg/dL, red blood cell 0.4%, triglyceride 500 mg/dL, glutathione 1000 µM, methionine 800 µM, cysteine 200 µM, pyruvate 1250 µM. Samples with raised protein levels show > 10% difference compared to results obtained from normal samples and should be avoided.

LIMITATIONS

- Cystathionin is measured with homocystein, but in the general population the cystathionin level (0.065 to 0.3 µmol/L) has a negligible effect. In very rare cases, end stage renal disease and patients with severe metabolic disturbances, cystathionin levels may rise dramatically and in severe cases cause greater than 20% interference.
- Hydroxylamine, present in several iron reagents may carryover (reagent probe or reaction cuvette) and cause falsely low results.
- Carbamazepine, methotrexate, phenytoin, nitrous oxide, or 6-azauridine triacetate may affect the homocystein concentration.¹
- Specimens from patients who are on drug therapy involving S-adenosyl-methionin may show falsely elevated levels of homocystein.

NOTES

SPINREACT has instruction sheets for several automatic analyzers. Instructions for many of them are available on request.

BIBLIOGRAPHY

1. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total Homocystein in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-1779
2. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, et al. Homocystein and Other Thiols in Plasma and Urine: Automated Determination and Sample Stability. *Clin Chem* 1993;39:263-271
3. Nehler MR, Taylor LM Jr, Porter JM. Homocysteinemia as a Risk Factor for Atherosclerosis: A Review. *Cardiovascular Pathol* 1997;6:1-9
4. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, et al. Plasma Total Homocystein in Healthy Subjects: Sex-Specific Relation with Biological Traits. *Am J Clin Nutr* 1996;64:587-593

PACKAGING

Ref:41057

Cont.	R1: 1x 30 mL R2: 1x 5 mL
-------	-----------------------------

Determinación cuantitativa de Homocisteína total (tHcy) IVD

Conservar a 2-8°C

USO RECOMENDADO

El reactivo Homocisteína se utiliza para la determinación cuantitativa *in vitro* de la homocisteína total en suero o plasma humanos. El kit ayuda en el diagnóstico y el tratamiento de pacientes con posible hiperhomocisteinemia y homocistinuria.

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La homocisteína unida o dimerizada (forma oxidada) se reduce a homocisteína libre, que entonces reacciona con la serina catalizada por la cistationina beta-sintasa (CBS) para formar la cistationina. A su vez, la cistationina beta-liasa (CBL) descompone la cistationina para formar la homocisteína, el piruvato y el amoníaco. Entonces el lactato deshidrogenasa (LDH) convierte el piruvato en lactato con nicotinamida adenina dinucleotida (NADH) como coenzima. El ritmo de conversión de la NADH a NAD⁺ es directamente proporcional a la concentración de homocisteína (Δ A340 nm).

SIGNIFICADO CLÍNICO

La homocisteína es un aminoácido que contiene tiol, producido por la desmetilación intracelular de la metionina. La homocisteína total (tHcy) representa la suma de todas las formas de Hcy entre las que se incluyen la oxidada, la ligada a proteína o la libre. Un nivel elevado de tHcy es un factor importante de riesgo en la evaluación de enfermedades cardiovasculares. Un exceso de homocisteína en sangre puede causar daños en los vasos arteriales debido a su naturaleza irritante, resultando en inflamación y formación plaquetaria, la cual puede finalmente bloquear el flujo de sangre al corazón. Los elevados niveles de tHcy son debidos a cuatro factores principalmente: a) deficiencias genéticas de enzimas involucrados en el metabolismo de la Hcy, tales como la cistationina beta-sintasa (CBS), metionina sintasa (MS) y la metilentrhidrofolato reductasa (MTHFR); b) deficiencia nutricional de vitaminas tales como B6, B12 y folato; c) fallo renal para la evacuación eficaz de aminoácidos y d) interacción de drogas tales como el óxido nítrico, metotrexato y fenitoína que interfieren en el metabolismo de la Hcy.

Niveles elevados de tHcy están también ligados al Alzheimer y a la osteoporosis.

REACTIVOS

R1	NADH (0,47 mM), LDH (38 KU/L), Serina (0,76 mM), Trizma Base 1-10%, Clorhidrato de trizma 1-10%, Azida Sódica < 1%, Reductor (TCEP:2,9 mM)
R2	Enzimas cíclicas CBS (0,748 KU/L) y CBL (16,4 KU/L) Azida Sódica < 1%.
Opcional	Ref. 1002276 Calibrador 2 x 3.0 mL Ref. 1002281 Control 3 x 1.5 mL

PRECAUCIONES

R1 y R2: Xn. R22: Nocivo por ingestión. R32: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos. S36/37/39: Lleve ropa protectora adecuada, guantes, gafas y máscara de protección. S29/35: No tirar los residuos por el desagüe. S46: En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrele la etiqueta o el envase.

CALIBRACION

Spinreact recomienda usar el Calibrador de tHcy (Ref: 1002276) para la calibración. Los calibradores están preparados gravimétricamente y son trazables para el NIST SRM 1955.

No es recomendable el uso de otros calibradores de tHcy comerciales.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

- Todos los reactivos del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación.
- No mezclar reactivos de diferentes lotes.
- **No congelar los reactivos.**
- No exponer el Reactivo 1 y Reactivo 2 a la luz durante su utilización en el instrumento.
- Evitar la contaminación de los reactivos. Utilizar una punta de pipeta desechable nueva para cada manipulación de reactivos o muestras.
- Los reactivos deben estar libres de partículas en suspensión. Deben descartarse si presentan un aspecto turbio.

MATERIAL ADICIONAL

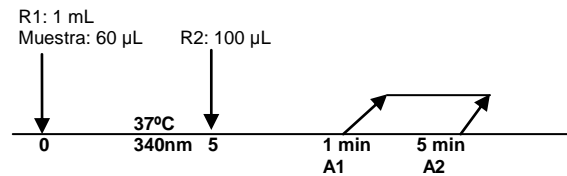
- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

- Suero fresco o plasma heparinizado. Es recomendable centrifugar las muestras de sangre inmediatamente tras la extracción, a fin de separar el plasma de las células sanguíneas. Si no es posible centrifugar inmediatamente las muestras de sangre extraídas, deben conservarse en hielo y centrifugarse en una hora.
- No utilizar muestras hemolizadas, con turbidez o lipémicas.
- Si el análisis se va a realizar en las 2 semanas posteriores a la recogida de las muestras, éstas se deben almacenar a 2-8°C. Si la prueba se va a retrasar más de 2 semanas, las muestras se deben congelar a \leq -20°C. Las muestras se mantienen estables durante 8 meses a -20°C.^{1,2}
- Para asegurar la reproducibilidad de los resultados, mezcle bien las muestras después de descongelarlas con un agitador de tubos tipo Vortex a baja velocidad o invirtiendo la muestra suavemente. No someta las muestras a múltiples ciclos de congelación y descongelación.

PROCEDIMIENTO

- Todos los componentes están listos para su uso.



CÁLCULOS

Calcular la diferencia de absorbancias (A2 - A1) obtenidas para ambos calibradores. Construir la curva de calibración lineal de los valores obtenidos frente a las concentraciones de tHcy Calibrador. La concentración de tHcy en la muestra se calcula por interpolación de su diferencia (A2- A1) en la curva de calibración.

CONTROL DE CALIDAD

Conviene analizar junto con las muestras, sueros control para validar el funcionamiento de los reactivos (Controles de rango normal y anormal Ref. 1002281). Cada laboratorio debe establecer las tolerancias límite para el control. Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

VALORES DE REFERENCIA

La bibliografía científica establece los valores de referencia para hombres y mujeres adultos de entre 5 µmol/L y 15 µmol/L. Los hombres presentan valores más elevados que las mujeres, y las mujeres postmenopáusicas presentan concentraciones de homocisteína mayores que las mujeres premenopáusicas.^{1,3,4} Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia para la población de su región.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Límite de detección: <0.33 µmol / L.

Rango de medida: El intervalo de valores lineales del reactivo Homocisteína es de 1-46 µmol/L. Las muestras > 46 µmol/L deberán diluirse con 1 parte de muestra a 2 partes Cal 0 µmol/L o 1 parte de muestra a 9 partes Cal 0 µmol/L según proceda.

Precisión:

El estudio se realizó según el protocolo EP-5 NCCLS. Se analizaron tres controles de HCY, en réplicas de dos, en dos momentos del día diferentes durante 20 días en un instrumento (n=80).

Nivel del control de Hcy	Precisión Intraserie			Precisión Total		
	Bajo	Medio	Alto	Bajo	Medio	Alto
Media(µM)	6.3	12.3	25.5	6.3	12.3	25.5
CV (%)	2.6	1.5	1.5	4.4	3.0	2.5

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 94 muestras de suero y plasma fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación $r = 0,999$.

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0.165 + 0.991x$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Las siguientes sustancias provocaban menos de un 10% de desviación cuando se testaban a las siguientes concentraciones: Bilirrubina 20 mg/dL, Hemoglobina 500 mg/dL, Eritrocitos 0.4%, Triglicéridos 500 mg/dL, Glutamina 1000 µM, Metionina 800 µM, Cisteína 200 µM, Piruvato 1250 µM. Las muestras con concentraciones elevadas de proteínas muestran una diferencia de >10% en comparación con los resultados obtenidos de muestras normales y deben evitarse.

LIMITACIONES

- La cistationina se mide con la homocisteína, pero en la población general la concentración de cistationina (de 0,065 µmol/L a 0,3 µmol/L) tiene un efecto negligible. En casos muy raros, en pacientes con nefropatía terminal y en pacientes con trastornos metabólicos graves, la concentración de cistationina puede aumentar considerablemente y en casos graves puede provocar una interferencia de más del 20%.
- La hidroxilamina, presente en varios reactivos de hierro puede dejar residuos (sonda de reactivo o cubeta de reacción) y provocar falsos resultados bajos.
- La carbamazepina, el metotrexato, la fenitoína, el óxido nítrico o el triacetato de 6-azauridina pueden afectar la concentración de homocisteína.¹
- Las muestras de los pacientes que están en tratamiento farmacológico con S-adenosilmetionina puede presentar niveles falsamente elevados de homocisteína.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

1. Refsum H, Stabler SP, et al. Total Homocysteine in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-1779
2. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, et al. Homocysteine and Other Thiols in Plasma and Urine: Automated Determination and Sample Stability. *Clin Chem* 1993;39:263-271
3. Nehler MR, Taylor LM Jr, Porter JM. Homocysteinemia as a Risk Factor for Atherosclerosis: A Review. *Cardiovascular Pathol* 1997;6:1-9
4. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Pilot A, et al. Plasma Total Homocysteine in Healthy Subjects: Sex-Specific Relation with Biological Traits. *Am J Clin Nutr* 1996;64:587-593

PRESENTACION

Ref:41057

Cont.

R1: 1x 30 mL

R2: 1x 5 mL