

## Quantitative determination of total Homocystein (tHcy) IVD

Store at 2-8°C

### INTENDED USE

The Homocysteine Reagent is intended for in vitro quantitative determination of total homocysteine 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

This assay consists of two key steps:

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

**Enzymatic Conversion:** Free HCY is converted to cystathionine using cystathionine beta-synthase (CBS) and excess serine. The cystathionine is then broken down to homocysteine, pyruvate and ammonia via cystathionine beta-lyase (CBL). Pyruvate is converted to lactate via lactate dehydrogenase (LDH) with nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) as coenzyme. The rate of NADH conversion to NAD<sup>+</sup> (measured at A340 nm) is directly proportional to the concentration of homocysteine

### CLINICAL SIGNIFICANCE

Homocysteine is a thiol-containing amino acid produced by the intracellular demethylation of methionine. Total homocysteine (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<sup>1,3</sup>. 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 cystathionine beta-synthase (CBS), methionine synthase (MS) and methylenetetrahydrofolate 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

<b>R1</b>	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
<b>R2</b>	Cycling Enzymes CBS (0,748 KU/L) and CBL (16,4 KU/L) Sodium Azide < 1%.
<b>Optional</b>	Ref. 1002276 Calibrator 2 x 3,0 mL Ref. 1002281 Control 3 x 1,5 mL

### PRECAUTIONS

R1/R2: H302-Harmful if swallowed. H412-Harmful to aquatic life with long lasting effects. Follow the precautionary statements given in MSDS and label of the product.

### CALIBRATION

Spinreact recommends using tHcy Calibrator (Ref: 1002276). The calibrators are prepared gravimetrically and are traceable to NIST SRM 1955.

### 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 Freeze.
- Do not use reagents over the expiration date.

### Signs of reagent deterioration:

- Presence of particles and turbidity.

### ADDITIONAL EQUIPMENT

- Spectrophotometer or colorimeter measuring at 340 nm.
- Thermostatic bath at 37° C (±0,1°C).
- Matched cuvettes 1.0 cm light path.
- General laboratory equipment.<sup>(Note 1)</sup>

### SAMPLES<sup>11</sup>

- Fresh serum (collected in serum or serum separator tubes) or plasma (collected in potassium EDTA or lithium heparin tubes). 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.<sup>3</sup>
- 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.<sup>1,2</sup>
- Mix specimens thoroughly after thawing by low speed vortexing or by gentle inversion to ensure consistency in results. Avoid repeated freezing and thawing.

### PROCEDURE

- Assay conditions:  
Wavelength: .....340 nm  
Cuvette: .....1 cm light path  
Temperature: .....37°C
- Adjust the instrument to zero with distilled water.
- Pipette into a cuvette <sup>(Note 2)</sup>.

	Calibrator	Sample
R1 (mL)	1,0	1,0
Calibrator (µL)	60	----
Sample (µL)	----	60

- Mix and incubate for 5 min at 37°C.

	Calibrator	Sample
R2 (µL)	100	100

- Mix carefully and read the absorbance A1 after 1 minute, and read the second absorbance A2 after 4 minutes.
- Calculate:  $\Delta A = A2 - A1$ .

### 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 tHcy 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 Quality Control scheme and corrective actions if controls do not meet the acceptable tolerances.

### REFERENCE VALUES

HCY concentrations in healthy individuals varies with age, gender, geographical areas and genetic factors. Scientific literature reports reference values for adult male and females between 5-15 µmol/L<sup>2,4,5</sup>.

A reference range among an elderly population (> 60 years) is 5-20 µmol/L<sup>6</sup>. In countries with folic acid fortification programmes, reduced levels of tHcy may be observed<sup>7,8</sup>. As a point of reference the ranges quoted above may be used until the laboratory has analysed a sufficient number of specimens to determine its own reference range.

These values are for orientation purpose; each laboratory should establish its own reference range.

### PERFORMANCE CHARACTERISTICS

**Measurement range:** From detection limit of 1 µmol/L to linearity limit of 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:

Mean (µmol/L)	Intra-assay (n=20)		Inter-assay (n=20)	
	SD	CV (%)	SD	CV (%)
7,0	0,133	1,9	36,0	0,308
35,5	0,468	1,3	3,5	0,817

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

The results obtained using 100 samples were the following:

Correlation coefficient (r)<sup>2</sup>= 0,99.

Regression equation: y= 0,97x + 0,49

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

### INTERFERENCES

Interfering Substance	Interfering Substance Concentration	% Interference
Bilirubin	20 mg/dL	≤ +10
Haemoglobin	500 mg/dL	≤ +10
Red Blood Cell	0,4 %	≤ +10
Triglyceride (Intralipid solution)	500 mg/dL	≤ +10
Glutathione	1000 µmol/L	≤ +10
Methionine	800 µmol/L	≤ +10
Cysteine	200 µmol/L	≤ +10
Pyruvate	1250 µmol/L	≤ +10

Samples with raised protein levels show >10% difference compared to results obtained from normal samples and should be avoided. None of these substances interfered significantly in the assay.

### LIMITATIONS

- Cystathionine is measured with homocysteine, but in the general population the cystathionine 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, cystathionine levels may rise dramatically and in severe cases cause greater than 20% interference<sup>9,10</sup>.
- 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 homocysteine concentration.<sup>1</sup>
- Specimens from patients who are on drug therapy involving S-adenosyl-methionine may show falsely elevated levels of homocysteine.

### NOTES

- In order to avoid contamination, it is recommended to use disposable material.
- Use clean disposable pipette tips for its dispensation.
- Spinreact has instruction sheets for several automatic. instructions for many of them are available on request.

### BIBLIOGRAPHY

- 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
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total Homocysteine in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-1779
- Ueland PM, Refsum H. Plasma Homocysteine, A Risk Factor for Vascular Disease: Plasma Levels in Health, Disease, and Drug Therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-501
- Nehler MR, Taylor LM Jr, Porter JM. Homocysteinemia as a Risk Factor for Atherosclerosis: A Review. *Cardiovascular Pathol* 1997;6:1-9
- Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolat A, et al. Plasma Total Homocysteine in Healthy Subjects: Sex-Specific Relation with Biological Traits. *Am J Clin Nutr* 1996;64:587-593
- Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, et al. Variability and Determinants of Total Homocysteine Concentrations in Plasma in an Elderly Population. *Clin Chem* 1998;44:102-107
- Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, et al. The Effect of Folic Acid Fortification on Plasma Folate and Total Homocysteine Concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449-1454
- Lawrence JM, Pettiti DB, Watkins M and Umekubo MA. Trends in Serum Folate after Food Fortification. *The Lancet* 1999;354:915-916
- Herrmann W, Schorr H, Obeid R, et al. Disturbed Homocysteine and Methionine Cycle Intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are Related to Degree of Renal Insufficiency in Type 2 Diabetes. *Clin Chem* 2005;51:1-7
- Obeid R, Kuhlmann MK, Kohler H, et al. Response of Homocysteine, Cystathionine, and Methylmalonic Acid to Vitamin Treatment in Dialysis Patients. *Clin Chem* 2005;51:196-201
- 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

### PACKAGING

Ref:41057 Cont. R1: 1x 30 mL  
R2: 1x 5 mL

# Homocisteína

## Enzimático cíclico. Líquido

### 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

Este ensayo consta de dos pasos clave:

**Reducción:** La homocisteína dimerizada, el disulfuro mixto y las formas de homocisteína (HCY) unidas a proteínas en la muestra se reducen para formar HCY libre usando tris [2-carboxietil] fosfina (TCEP).

**Conversión enzimática:** La HCY libre se convierte en cistionina usando cistionina beta-sintasa (CBS) y exceso de serina. La cistionina se descompone entonces en homocisteína, piruvato y amoníaco a través de beta-liasa de cistionina (CBL). El piruvato se convierte en lactato mediante lactato deshidrogenasa (LDH) con nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) como coenzima.

La velocidad de conversión de NADH en NAD<sup>+</sup> (medida a A340 nm) es directamente proporcional a la concentración de homocisteína.

#### 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<sup>1,3</sup>. 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 involucradas en el metabolismo de la Hcy, tales como la cistionina beta-sintasa (CBS), metionina sintasa (MS) y la metilтетrahidrofolato 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

<b>R1</b>	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)
<b>R2</b>	Enzimas cíclicas CBS (0,748 KU/L) y CBL (16,4 KU/L) Azida Sódica < 1%.
<b>Opcional</b>	Ref. 1002276 Calibrador 2 x 3,0 mL Ref. 1002281 Control 3 x 1,5 mL

#### PRECAUCIONES

R1/R2: H302-Nocivo por ingestión. H412-Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Seguir los consejos de prudencia indicados en la FDS y etiqueta del producto.

#### 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.

#### 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 congelar.

- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.

#### Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

#### MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.

- Baño termostático a 37°C (±0,1°C)

- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.

- Equipamiento habitual de laboratorio. (Nota 1)

#### MUESTRAS<sup>11</sup>

- Suero fresco (recogido en suero o tubos de separación de suero) o plasma (recogido en tubos de EDTA de potasio o de heparina de litio). 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<sup>3</sup>.

- 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 ≤-20°C. Las muestras se mantienen estables durante 8 meses a -20°C.<sup>1,2</sup>

- 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

1. Condiciones de ensayo:

Longitud de onda: .....340 nm

Cubeta: .....1 cm paso de luz

Temperatura: .....37°C

2. Ajustar el instrumento a cero frente a agua destilada.

3. Pipetear en una cubeta (Nota 2).

	Patrón	Muestra
R1 (mL)	1,0	1,0
Patrón (µL)	60	---
Muestra (µL)	---	60

4. Mezclar e incubar durante 5 min a 37°C.

5. Añadir:

	Patrón	Muestra
R2 (µL)	100	100

6. Mezclar cuidadosamente y leer la absorbancia A1 después de 1 minuto, y leer la segunda absorbancia A2 después de otros 4 minutos.

7. Calcular:  $\Delta A = A2 - A1$ .

#### 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).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

#### VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de HCY en individuos sanos varían con la edad, el género, las áreas geográficas y los factores genéticos. La literatura científica reporta valores de referencia para hombres y mujeres adultos entre 5-15 µmol/L<sup>2,4,5</sup>.

Un rango de referencia entre una población mayor (> 60 años) es de 5-20 µmol/L<sup>5</sup>. En países con programas de fortificación con ácido fólico se pueden observar niveles reducidos de tHcy<sup>7,8</sup>. Como punto de referencia, los intervalos citados anteriormente pueden utilizarse hasta que el laboratorio haya analizado un número suficiente de especímenes para determinar su propio intervalo de referencia.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia para la población de su región.

#### CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

**Rango de medida:** Desde el límite de detección de 1 µmol/L hasta el límite de linealidad de 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.

#### Exactitud:

Media (µmol/L)	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
	7,0	36,0	7,0	35,5
SD	0,133	0,468	0,308	0,817
CV (%)	1,9	1,3	4,4	2,3

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

Los resultados obtenidos con 100 muestras de suero y plasma fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r)<sup>2</sup>= 0,99.

Ecuaación de la recta de regresión: y= 0,97x + 0,49.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

#### INTERFERENCIAS

Substancia interferente	Concentración de substancia interferente	% Interferencia
Bilirrubina	20 mg/dL	≤ +10
Hemoglobina	500 mg/dL	≤ +10
Glóbulos rojos	0,4 %	≤ +10
Triglicéridos (Solución intralípido)	500 mg/dL	≤ +10
Glutación	1000 µmol/L	≤ +10
Metionina	800 µmol/L	≤ +10
Cisteína	200 µmol/L	≤ +10
Piruvato	1250 µmol/L	≤ +10

#### LIMITACIONES

- La cistionina se mide con la homocisteína, pero en la población general la concentración de cistionina (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 cistionina puede aumentar considerablemente y en casos graves puede provocar una interferencia de más del 20%.<sup>9,10</sup>

- 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.<sup>1</sup>

- Las muestras de los pacientes que están en tratamiento farmacológico con S-adenosilmetionina puede presentar niveles falsamente elevados de homocisteína.

#### NOTAS

1. A fin de evitar contaminaciones se recomienda utilizar material desechable.

2. Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación

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

#### BIBLIOGRAFÍA

- 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
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total Homocysteine in Plasma or Serum: Methods and Clinical Applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-1779
- Ueland PM, Refsum H, Plasma Homocysteine, A Risk Factor for Vascular Disease: Plasma Levels in Health, Disease, and Drug Therapy. *J Lab Clin Med* 1989;114:473-501
- Nehrer MR, Taylor LM Jr, Porter JM. Homocysteinemia as a Risk Factor for Atherosclerosis: A Review. *Cardiovascular Pathol* 1997;6:1-9
- Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, et al. Plasma Total Homocysteine in Healthy Subjects: Sex-Specific Relation with Biological Traits. *Am J Clin Nutr* 1996;64:587-593
- Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, et al. Variability and Determinants of Total Homocysteine Concentrations in Plasma in an Elderly Population. *Clin Chem* 1998;44:102-107
- Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, et al. The Effect of Folic Acid Fortification on Plasma Folate and Total Homocysteine Concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449-1454
- Lawrence JM, Pettitt DB, Watkins M and Umekubo MA. Trends in Serum Folate after Food Fortification. *The Lancet* 1999;354:915-916
- Herrmann W, Schorr H, Obeld R, et al. Disturbed Homocysteine and Methionine Cycle Intermediates S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine are Related to Degree of Renal Insufficiency in Type 2 Diabetics. *Clin Chem* 2005;51:1-7
- Obeld R, Kuhlmann MK, Kohler H, et al. Response of Homocysteine, Cystathionine, and Methylmalonic Acid to Vitamin Treatment in Dialysis Patients. *Clin Chem* 2005;51:196-201
- 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

#### PRESENTACION

Ref:41057

R1: 1x 30 mL

R2: 1x 5 mL

