

Dosaggio dell'omocisteina: confronto tra metodo in cromatografia liquida ad alta pressione e metodica enzimatica (Minias) su strumento Olympus

A. Colatutto, R. Zaglia, S. Mazzolini, P. Sala

Laboratorio Analisi d'Elezione, Azienda Ospedaliero Universitaria, Udine

Riassunto

Premesse. L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido contenente zolfo derivante dal metabolismo della metionina. Molti lavori hanno dimostrato la stretta relazione esistente tra iperomocisteinemia e sviluppo di malattie metaboliche e cardiovascolari. Recenti dati sperimentali hanno dimostrato che l'effetto dannoso dell'iperomocisteinemia è associato allo sviluppo di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Studi policentrici tesi a valutare l'impatto diagnostico della determinazione dell'omocisteina come fattore di rischio di disturbi cardiovascolari (CVD), sono stati avviati in tutto il mondo.

Metodi. Si rende necessaria quindi l'introduzione di metodiche automatizzate, utilizzabili anche da piccoli laboratori, in sostituzione di quelle in cromatografia ad alta pressione (HPLC) e in gas-cromatografia, assolutamente inadatte a test di screening e che necessitano di risorse economiche e professionali impegnative.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare, la metodica di riferimento

HPLC-System Gold, con la metodica enzimatica Homocystein T(Hcy) della Minias, su analizzatore Olympus AU2700.

Risultati. La sensibilità della metodica enzimatica è risultata essere di gran lunga superiore a quella della metodica di riferimento. I dati delle due metodiche risultano del tutto sovrapponibili. Rielaborando i dati mediante regressione lineare abbiamo rilevato un'ottima correlazione tra le metodiche al di sotto di 30 mM/L ($r = 0,984$).

Conclusioni. In conclusione riteniamo che il test enzimatico, per le sue caratteristiche di affidabilità, ripetibilità, facile ed immediata esecuzione e totale automazione possa sostituire la procedura in HPLC.

Summary

The dosage of homocysteine: Comparison between high-pressure liquid chromatography (HPLC) and enzymatic method (Minias) on a Olympus instrument

Background. The homocysteine (HCY) is a sulphur containing amino-acid derived from the methionine metabolism.

Several essays have proved the close relation between hyperhomocysteinemia and the growth of metabolic and neurodegenerative illness. Recent experimental data have proved that the damaging effects of hyperhomocysteinemia are associated to the growth of reactive oxygen species (ROS).

Polycentric studies aiming to value the diagnostic impact of the homocysteine determination as a risks factor of cardiovascular disease (CVD) have been initiated all over the world.

Methods. It is necessary therefore to introduce automated methods, utilizable by small laboratories too, instead of those in HPLC and in gas chromatography, absolutely inapt to screening tests, which need compelling economic and professional resources. Our work's purpose has been to compare the reference method HPLC-System Gold with the enzymatic method homocysteine T(HCY) of Minias on analyser Olympus AU2700.

Result. The sensitivity of enzymatic resulted to be much better than the reference method. The data of the two methods come out to be completely superimposed. Elaborating the date by linear regression we noted a very good correlation between the methods under 30 mmol/L ($r = 0,984$).

Conclusions. We believe that the enzymatic test, because of its peculiarity of trusting, repetition, easy and immediate execution and total automation can replace the procedure in HPLC.

Key words: hyperhomocysteinemia, free radicals, cardiovascular disease, enzymatic method, linear regression.

Tabella I. Procedimenti operativi a confronto.

	ENZIMATICO	HPLC
Quantità di campione	15 µl	300 µl
Procedure manuali	Nessuna	1) Dispensazione manuale di 300 µl di campione. 2) Dispensazione di 30 µl di TBF 3) Incubazione 4) Dispensazione di 300 µl di TCA 5) Centrifugazione 6) Dispensazione di 100 µl di surnatante. 7) Dispensazione di 290 µl di ABDF 8) Incubazione 9) Centrifugazione 10) Iniezione in colonna
Tempo di analisi	25'	2 – 3 h
Refertazione	Automatica	Manuale

Introduzione

Vigneaud nel 1931 scoprendo l'omocisteina, inizia un lungo percorso destinato a far luce su quello che più tardi, si scoprirà essere uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di patologia cardiovascolare^{1,2}, tromboembolica, di arteriopatie periferiche e cerebrovasculopatie indipendente dal colesterolo.

La possibilità dell'omocisteina d'essere rimetilata a metionina utilizzando metili messi a disposizione dalla riduzione del 5-10-MetilTetraIdroFolato è alla base della terapia con acido folico²⁻⁵. La relazione esistente tra omocisteina e folati è tale che una carenza di folati (sia per ridotto apporto alimentare sia, per ridotto assorbimento intestinale) è la prima causa da ricercare in caso d'iperomocisteinemia⁶⁻⁸.

La determinazione dell'omocisteina può essere influenzata da diversi fattori preanalitici per questo è necessario prestare particolare attenzione alle modalità di raccolta, manipolazione e conservazione dei campioni.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare la metodica di riferimento HPLC-System Gold con la metodica enzimatica Homocystein T (Hcy) della Minias (S.R.L. Savona, Italia), su analizzatore automatizzato Olympus AU2700 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germania), per valutare la possibilità di sostituire una metodica totalmente automatizzata a quella attualmente in uso, con riduzione dei tempi di attesa dei referti e un minor impegno tecnico.

Materiali e metodi

Il dosaggio dell'omocisteina è stato eseguito su 148 campioni, raccolti in provette contenenti gel e centrifugati entro un'ora dall'arrivo in laboratorio. Per ciascun campione si sono quindi preparate due aliquote che sono state refrigerate e conservate a -20°C.

I pazienti sono stati scelti tra quelli afferenti al Dipartimento di diagnostica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Udine per il dosaggio di folati e Vit.B₁₂,

allo scopo di avere una migliore distribuzione dei valori nelle diverse classi. Per il dosaggio dell'omocisteina in HPLC sono state necessarie quattro sedute analitiche, di circa 4 ore ciascuna. Si è utilizzato un'apparecchiatura per HPLC della ditta Beckman (Milano) con colonna Merck, autocampionatore da 40 posti e detector fluorimetrico con registratore di cromatogrammi.

La metodica è tiolo specifica e separa i quattro principali tioli: omocisteina, cisteinglicina, cistina e glutatone, l'ordine di uscita dipende dal pH. L'omocisteina è in gran parte legata in

forma di disolfuri con l'albumina, solo una quota non superiore al 10-15% è libera.

La fase preanalitica in HPLC prevede il trattamento con agenti riducenti (acido tricloroacetico) e legame con fluoroforo.

Il dosaggio dell'omocisteina con metodica enzimatica, è stato effettuato con l'analizzatore automatico Olympus AU2700 in un'unica seduta analitica, utilizzando il test enzimatico Homocystein T (Hcy) della ditta Minias con lettura fotometrica a 340 nanometri della diminuzione di assorbanza dovuta all'ossidazione del NADH a NAD⁺. Le procedure seguite per l'analisi dell'omocisteina con i due metodi analitici sono descritte in Tabella I.

Risultati

L'analisi statistica dei valori ottenuti dalla determinazione dell'Hcy in HPLC ha mostrato una media di 13,52 e mediana di 10,75 µM/L, mentre su Olympus con metodica enzimatica una media di 20,42 e mediana di 17,35 µM/L.

I dati sono stati elaborati mediante regressione lineare, dalla quale emerge un'ottima correlazione tra i due metodi considerati ($r = 0,984$) (Fig. 1).

La retta che rappresenta tale parametro ha mostrato una pendenza o coefficiente angolare di 0,800; tale valore essendo diverso da 1 dimostra naturalmente l'esi-

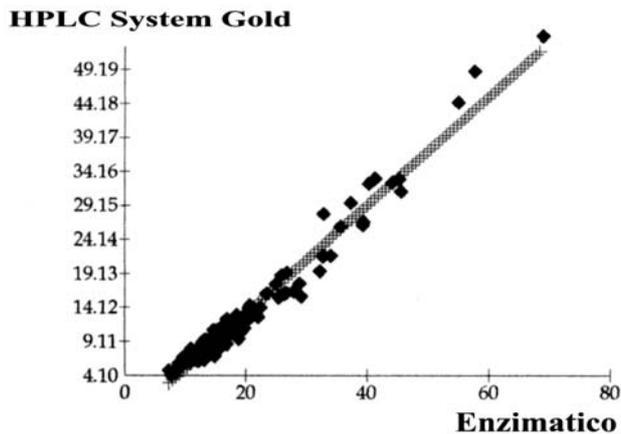


Figura 1. Correlazione tra i valori di omocisteina plasmatica ottenuti utilizzando una metodica in HPLC e una metodica enzimatica.

stenza di una differenza tra le metodiche, per questo abbiamo successivamente correlato la differenza Olympus-HPLC con i valori di omocisteina ottenuti con Olympus rilevando una maggiore differenza per i valori più elevati (Fig. 2).

La differenza statisticamente significativa tra i due metodi, si evidenzia per valori dell'analita superiori a 30 $\mu\text{M}/\text{L}$. Per valori al di sopra di 30 mM/L , si raccomanda la ripetizione in HPLC o gas-cromatografia.

Per valutare la precisione del nuovo metodo enzimatico, la determinazione dell'Hcy è stata ripetuta 20 volte su sieri a tre livelli di concentrazione (Tab. II).

Le due metodiche sono state poi confrontate con il test di Bland-Altman, da cui si evidenzia che le differenze tra i due metodi non sono costanti ma dipendono dal valore. La deviazione standard aumenta all'aumentare della concentrazione, sebbene al di sotto delle 30 $\mu\text{M}/\text{L}$ i punti si trovano all'interno dell'intervallo di confidenza di $\pm 1,96$ DS, valore di concentrazione al di sotto della quale i due metodi forniscono risultati congruenti tra loro e quindi le due metodiche possono essere considerate intercambiabili (Fig. 3).

Conclusioni

Negli ultimi vent'anni lo studio dell'omocisteina su campioni di popolazione sempre più vasti⁹⁻¹² ha fatto emergere la necessità di introdurre il dosaggio tra i test di screening per pazienti a rischio di malattie tromboemboliche e malattie cardiovascolari (CVD).

La determinazione dell'omocisteina non è più una metodica sperimentale effettuata su selezionati campioni di popolazione, ma è sempre più utilizzata per la valutazione del rischio complessivo di CVD.

Tabella II. Media e DS su tre sieri a diversa concentrazione di Hcy.

	Liv.1	Liv.2	Liv.3
Media	10.35	21.46	34.58
Deviazione Standard	0.46	0.40	0.37

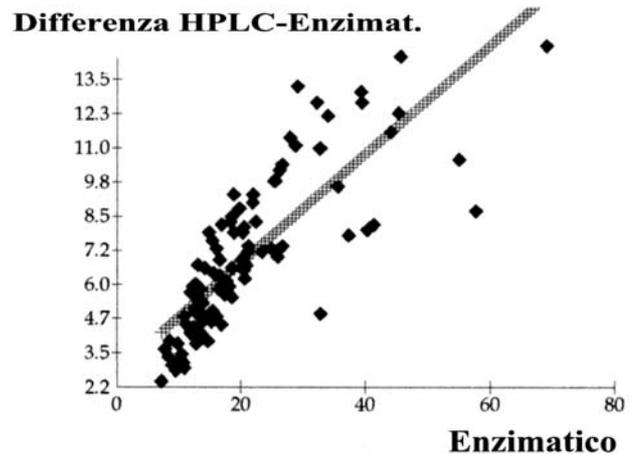


Figura 2. Correlazione tra i valori di omocisteina con metodica enzimatica e la differenza tra i due metodi (HPLC-enzimatico).

Quest'aspetto ha condizionato la spinta delle case produttrici e dei laboratoristi verso lo studio e lo sviluppo di metodiche alternative all'HPLC.

Rivestono in tal senso primaria importanza le metodiche enzimatiche, indubbiamente più "friendly" rispetto alle metodiche in HPLC o in gas-cromatografia.

Il nostro contributo è consistito nello sviluppare e mettere a punto una metodica alternativa all'HPLC.

Il raggiungimento di questo obiettivo è stato ostacolato da alcune problematiche, come ad esempio la mancanza di un "reference standard", che ha condizionato fortemente la confrontabilità dei risultati tra laboratori.

Inoltre non sono ancora ben chiare le modalità di legame dell'omocisteina con le varie componenti proteiche del sangue¹³. Infatti, un problema emerso nelle prime fasi dello studio è dato dal fatto che la determinazione enzimatica era "particolarmente" sensibile. L'apparente sopravvalutazione dei valori di omocisteina ottenuti col metodo enzimatico trova la sua ragione nella capacità del test enzimatico di dosare la somma di tutte le forme di Hcy sia libera sia legata, mentre nell'HPLC ed in gas-cromatografia questo problema è ovviato dalla deprotenizzazione.

Nel nostro sistema Olympus siamo stati in grado di ovviare alla sovrastima, introducendo un fattore di correzione che ha portato un'ottima sovrapposizione delle due metodiche.

Noi riteniamo che allo stato attuale si possa utilizzare questo metodo enzimatico avendone comprovato l'altissima correlazione con la metodica di riferimento HPLC System gold.

Vi è consapevolezza del fatto che per trarre delle conclusioni definitive servono ancora ulteriori passaggi che implicheranno:

- L'utilizzo di uno standard di riferimento che comporti una sovrapposibilità di risultati tra diversi laboratori.

- L'introduzione di range di riferimento condivisi fra i clinici, per fasce di età, e per sesso¹⁴⁻¹⁶.

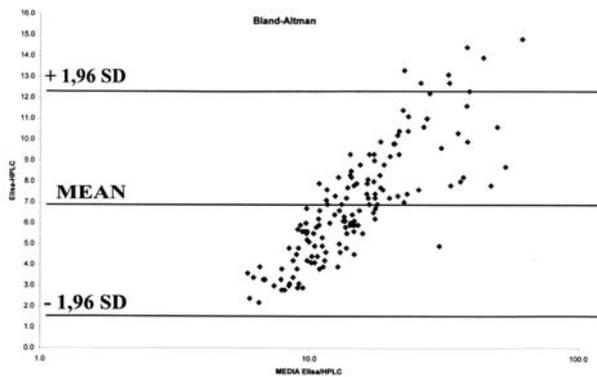


Figura 3. Grafico di Bland-Altman con in ascissa la media di ogni coppia di valori ottenuta con i due metodi e in ordinata il logaritmo delle differenze.

Il dosaggio dell'omocisteina su strumentazione automatica Olympus AU2700 si è dimostrato nel corso di questo studio, di facile e pronta esecuzione. Introducendo i valori di intercetta e pendenza della retta di regressione direttamente nel software dell'Olympus è possibile convertire i dati ai valori attesi del metodo correlato e trasmetterli al sistema informatico LISS.

Queste caratteristiche, in aggiunta alla potenziale riduzione degli errori preanalitici legati, alla dispensazione manuale del campione e dei reattivi, alla possibilità di una refertazione automatica, con forte riduzione dei tempi d'attesa, e alla disponibilità immediata di esecuzione dell'indagine, fanno della metodica enzimatica una procedura di prima scelta.

Per concludere possiamo affermare che il nostro studio deve essere considerato un primo passo verso uno studio prospettico e policentrico per valutare nel tempo l'utilità dell'impatto clinico nel dosaggio dell'Hcy quale fattore di rischio nelle malattie cardiovascolari e tromboemboliche.

Bibliografia

1. Assanelli D, Bonanome A, Pezzini A, Albertini F, Maccalli P, Grassi M, et al. Folic acid and Vitamin E supplementation effects on homocysteinemia, endothelial function and plasma antioxidant capacity in young myocardial infarction patients. *Pharmacol Res* 2004; 49:79-84.
2. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefits of increasing folic acid intakes. *JAMA* 1995; 274:1049-57.
3. Buccianti C, Raselli S, Baragetti I, Bamonti F, Corghi E, Novembrino C. 5-methyltetrahydrofolate restores endothelial function in uraemic patients on convective haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17:857-61.
4. Coppola A, Di Mimmo G. L'uso farmacologico dei folati: prospettive attuali. *Riv. It. Ost.Gin.* 2004; 1:21-5.
5. Covers R, Rabelink TJ. Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280:193-6.
6. D'Angelo A, Coppola A, Madonna P, Fermo I, Pagano A, Mazzola G, et al. The role of vitamin B12 in fasting hyperhomocysteinemia and its interaction with the homozygous C677T mutation of the MTHFR gene. *Thromb Haemost* 2000; 83:563-70.
7. Das UN. Folic acid says No to vascular diseases. *Nutrition* 2003; 19:686-90.
8. Davi G, Di Minno G, Coppola A, Andria G, Cerbone AM, Madonna P, et al. Oxidative Stress and Platelet Activation in Homozygous Homocystinuria. *Circulation* 2001; 104: 1-124.
9. Den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998; 80:874-7.
10. Doshi SN, McDowell FW, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, et al. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering. *Circulation* 2002; 105: 22-6.
11. Eikelboom JW, Lonn E, Genest J Jr, Hankey G, Yusuf S. Homocysteine and cardiovascular disease: a critical review of the epidemiologic evidence. *Ann Intern Med* 1999; 131:363-75.
12. Erickson JD. Folic acid and prevention of spina bifida and anencephaly. 10 years after the U.S. Public Health Ser. recommendation. *MMWR Recomm Rep.* 2002; 51:1-3.
13. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Nanetti L, Curatola G, et al. Effect of homocysteinylated low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2004; 92:51-60.
14. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, Robinson K, Brattstrom LE, Veland PM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: the European Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277:1775-81.
15. Guttormsen AB, Ueland PM, Nesthus I. Determinants and vitamin responsiveness of intermediate hyperhomocysteinemia. *J. Clin. Invest* 1996; 98:2174-83.
16. Kluijtmans LA, Young IS, Boreham CA. Genetic and nutritional factors contributing to hyperhomocysteinemia in young adults. *Blood* 2003; 101:2483.