

Confronto fra diversi metodi di dosaggio dell'omocisteina plasmatica

M.G. Coppola^a, B. Porcelli^a, M. Salvi^b, D. Mattioli^b, C. Scapellato^b, L. Terzuoli^a

^aDipartimento di Medicina Interna, Scienze Endocrino-Metaboliche e Biochimica, sez. Biochimica, Università di Siena,

^bLaboratorio di Analisi Chimico-Cliniche, Azienda Ospedaliera Universitaria Senese, Siena

L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido non proteico prodotto dal metabolismo della metionina, un aminoacido solforato essenziale che viene introdotto nel nostro organismo con la dieta.

Negli ultimi anni ha assunto un'importanza crescente l'interesse per l'iperomocisteinemia che viene ormai considerata un forte ed indipendente fattore di rischio per lo sviluppo di disturbi cardiovascolari, cerebrovascolari e vascolari periferiche¹. Alcuni studi affermano che tra soggetti cardiopatici sottoposti a procedure di rivascolarizzazione percutanea quelli che presentano elevati livelli di Hcy plasmatici hanno un maggior rischio di sviluppare restenosi². L'Hcy sembra avere un ruolo importante anche nello sviluppo dei disordini cronici del rene³. Concentrazioni di Hcy oltre la norma raddoppiano il rischio di trombosi venosa profonda⁴. L'iperomocisteinemia è un fattore di rischio indiscusso per lo sviluppo della demenza e della malattia di Alzheimer⁵. L'Hcy sembrerebbe giocare un ruolo molto importante anche in gravidanza; elevati livelli di questo aminoacido sono stati osservati infatti nelle donne affette da preeclampsia, distacco prematuro di placenta e aborti spontanei; inoltre, nelle madri dei nati in sottopeso e nel 20% di quelle dei nati con difetti del tubo neurale, tra cui la più comune anomalia è la spina bifida, si è osservato un elevato livello di Hcy⁶.

In ultimo, l'iperomocisteinemia è stata anche chiamata in causa nelle fratture ossee da osteoporosi, in uno studio del 2004 infatti è stata valutata l'associazio-

ne fra i livelli plasmatici di Hcy ed il rischio di frattura osteoporotica⁷.

Da quanto detto è evidente l'importanza di un rapido metodo di determinazione dei valori nel plasma dell'Hcy e, in particolare, l'introduzione di una metodica automatizzata che permetta un'analisi routinaria dell'Hcy. La tecnica di scelta di un laboratorio dovrebbe essere economica, veloce e poco impegnativa per l'operatore. Il golden standard per il dosaggio dell'Hcy è il metodo tramite Cromatografia Liquida ad Alta Pressione (HPLC)⁸, ma a questo nuove proposte si sono affiancate, proprio nel tentativo di rendere più veloce e non operatore dipendente il dosaggio.

Per tale scopo abbiamo confrontato tre metodi di dosaggio dell'Hcy totale plasmatica: il metodo HPLC (HPLC Shimadzu, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan), il metodo nefelometrico (N Latex HCY, Dade Behring Marburg GmbH, USA) e un dosaggio enzimatico (Liquid stable 2-Part Homocysteine reagent, AXIS-SHIELD, su carta Olympus AU400) per verificare se le tre tecniche fossero fra loro sovrapponibili e quali delle tre potesse rappresentare il metodo più vantaggioso per un laboratorio di analisi con un notevole numero di richieste.

E' stato analizzato il sangue, raccolto in tubi contenenti EDTA e centrifugato (1000g x 15 minuti) entro 2 ore dalla raccolta, prelevato da 50 volontari sani. I dati sono stati elaborati mediante regressione lineare utilizzando il software GraphPad Prism.

La determinazione della Hcy è risultata del tutto sovrapponibile per i metodi HPLC e nefelometrico ($r^2 = 0,929$), mentre non si è osservata una significativa correlazione tra HPLC e il metodo enzimatico ($r^2 = 0,008$) e tra quest'ultimo e il metodo nefelometrico ($r^2 = 0,054$).

Dai risultati emerge che il metodo nefelometrico e la metodica in HPLC sono interscambiabili per la determinazione dell'Hcy totale plasmatica. Per un utilizzo routinario in un laboratorio centralizzato risulta, tuttavia, più vantaggioso il nefelometro per la velocità di analisi e la scarsa dipendenza dell'operatore. Infatti, l'HPLC è una tecnica più costosa e molto impegnativa soprattutto nell'iniziale preparazione del campione con il processo di riduzione e derivatizzazione.

Al contrario, benché il metodo enzimatico presenti notevoli vantaggi, tra cui quello di essere inserito all'interno dell'analizzatore della chimica-clinica con il riconoscimento automatico del campione e dell'analisi da eseguire e una notevole velocità di esecuzione dell'analisi stessa, esso non può ancora essere considerato attendibile per un dosaggio di routine.

Questo ci porta a concludere che per un servizio efficiente, che risponda velocemente e bene alle numerose richieste che pervengono ad un laboratorio di analisi chimico-cliniche, il dosaggio plasmatico dell'Hcy eseguito al nefelometro sia completamente soddisfacente.

Bibliografia

1. Clarke R, Daly L, Robinson K. Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991; 324:1149-55.
2. Schnyder G, Roffi M, Flammer Y, Pin R, Hess OM. Association of plasma homocysteine with restenosis after percutaneous coronary angioplasty. *Eur Heart J* 2002; 23:726-33.
3. Shankar A, Wang JJ, Chua B, Rochtchina E, Flood V, Mitchell P. Positive association between plasma homocysteine level and chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 2008; 31:55-62.
4. Caprini JA, Goldshteyn S, Glase CJ, Hathaway K. Thrombophilia Testing in Patients with Venous Thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2005; 30:550-5.
5. Seshadri S, Beiser A, Selhub J, Jacques PF, Rosenberg IH, D'Agostino RB, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 2002; 346:476-83.
6. Ray JG, Laskin CA. Folic acid and homocysteine metabolic defects and the risk of placental abruption, preeclampsia and spontaneous pregnancy loss: a systematic review. *Placenta* 1999; 20:519-29.
7. Van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R, Lindemans J, et al. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. *N Engl J Med* 2004; 350:2033-41.
8. Kuo K, Still R, Cale S, McDowell I. Standardization (external and internal) of HPLC assay for plasma homocysteine. *Clin Chem* 1997; 43:1653-5.