

Instructions for use  
Mode d'emploi  
Gebrauchsanweisung  
Istruzioni per l'uso  
Instrucciones de uso  
Instruções da utilização  
Bruksanvisningen  
Brugervejledning

# Axis® Homocysteine EIA

**REF** FHCY100



Axis-Shield Diagnostics Ltd.  
The Technology Park  
Dundee DD2 1XA  
United Kingdom  
Tel: +44 (0) 1382 422000  
Fax: +44 (0) 1382 422088



AXIS-SHIELD

**REF**

Product code / Numéro de produit / Artikelnummer / Codice Prodotto / Número de lista / Número de lista / Artikelnumret / Produktnummer

**IVD**

For *in vitro* diagnostic use / Pour usage diagnostique *in vitro* / Nur zur *In-vitro*-Diagnose verwenden / Per uso dignostico *in vitro* / Para diagnóstico *in vitro* / Para diagnóstico *in vitro* / För *in vitro*-diagnostisk användning / Til *in vitro*-diagnostisk brug

**LOT**

Lot number / Numéro de lot / Chargennummer / Numero lotto / Número de lote / Número do lote / Lotnummer / Partinummer



Consult instructions for use / Consulter le mode d'emploi / Gebrauchsanweisung beachten / Leggere le istruzioni per l'uso / Consulte las instrucciones de uso / Consultar instruções da utilização / Se bruksanvisningen / Se brukervejledning



Expiration date / Date de péremption / Verfallsdatum / Data di scadenza / Fecha de caducidad / Data de validade / Utgångsdatum / Udløpsdato



Store at 2-8 °C / Stocker entre 2 et 8 °C / Lagerung bei 2-8 °C / Conservare a 2-8 °C / Manténgase de 2-8 °C / Conservar entre 2-8 °C / Förvaras vid 2-8 °C / Opbevares ved 2-8 °C



CAUTION! Handle human sourced materials as potentially infectious. Consult instructions for use (Infection Risk) / ATTENTION! Manipuler les produits d'origine humaine comme des produits potentiellement infectieux. Consulter le mode d'emploi (risque d'infection) / ACHTUNG! Aus Humanmaterial gewonnene Stoffe immer als potenziell infektiös behandeln. Gebrauchsanweisung beachten (Infektionsgefahr) / ATTENZIONE! Maneggiare i materiali di origine umana come potenzialmente infetti. Leggere le istruzioni per l'uso (Rischio di infezione) / PRECAUCIÓN: Maneje los materiales de origen humano como potencialmente infecciosos. Consulte las instrucciones de uso (riesgo de infección) / CUIDADO! Trate os materiais de origem humana como potencialmente infecciosos. Consulte as instruções de utilização (Risco de Infecção) / WARNING! Hantera material med mänskligt ursprung som eventuell smittofara. Se bruksanvisningen (Infektionsrisk) / FORSIGTIG! Materiale fra humane kilder skal håndteres som potentielle smittekilder. Se brugervejledningen (infektionsrisiko)

**CONTROL KIT**

Control Kit / Kit de contrôles / Kontroll Kit / Kit di controlli / Kit de control / Kit de controlo / Kontrollkit / Kontrol kit

**CALIBRATOR KIT**

Calibrator Kit / Kit d'étalons / Kalibrator Kit / Kit de calibratori / Kit de calibrador / Kit de calibração / Kalibratorkit / Kalibrator kit



96 tests / 96 testes / 96 Tests / 96 test / 96 ensayos / 96 testes / 96 tester / 96 prøver

**REAG A**

Reagent A-S / Réactifs A à S / Reagens A-S / Reagenti A-S /  
Reactivo A-S / Reagente A-S / Reagens A-S / Reagens A-S

**BUF WASH**

Wash Buffer / Tampon de lavage / Waschpuffer / Tampone di  
lavaggio / Tampón de Lavado / Solução tamponada de lavagem  
/ Tvättbuffert / Vaskebuffer

**CAL 1**

Calibrator 1-6 / Etalons 1 à 6 / Kalibrator 1-6 / Calibratori 1-6 /  
Calibrador 1-6 / Calibrador 1-6 / Kalibrator 1-6 / Kalibrator 1-6

**CONTROL L**

Control low, medium, high (L, M, H) / Contrôle bas, moyen,  
haut (L, M, H) / Kontrolle: niedrig, mittel, hoch (L, M, H) / Con-  
trollo basso, medio, alto (L, M, H) / Control bajo, medio, alto  
(L, M, H) / Controlo baixo, médio, alto (L, M, H) / Kontroll låg,  
medel, hög (L, M, H) / Kontrol lav, medium, høj (L, M, H)

**MICROTITRE STRIPS**

Microtitre Strips / Barrettes de microtitrage / Mikrotiter-streifen  
/ Strisce di Microtitolazione / Tiras Microtiter / Tiras de micro-  
titulação / Mikrotiter-remsor / Mikrotiter-strips

## Inhalt

Verwendungszweck.....	23
Zusammenfassung und Erläuterung des Tests .....	23
Testprinzip .....	24
Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise .....	24
Bestandteile des Kits.....	25
Vorbereitung und Lagerung der Kit Komponenten .....	26
Probenentnahme und -lagerung .....	27
Einschränkungen .....	27
Testdurchführung .....	27
Interpretation der Ergebnisse .....	29
Qualitätskontrolle .....	29
Referenzbereich.....	29
Messbereich .....	29
Leistungsdaten .....	30
Informationen zum sicheren Umgang mit den Produkten .....	31
Literaturhinweise .....	71

## Verwendungszweck

Der Axis® Homocysteine Enzyme Immunoassay (EIA) ist zur quantitativen Bestimmung der Gesamtkonzentration von L-Homocystein in Humanserum und -plasma vorgesehen. Die Homocysteinwerte unterstützen die Diagnose und Behandlung von Patienten mit Verdacht auf Hyperhomocysteinämie oder einer Homocystinurie.

## Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Homocystein (Hcy) ist eine thiolhaltige Aminosäure, die durch intrazelluläre Demethylierung von Methionin entsteht. Hcy wird ins Plasma exportiert, wo es zum größten Teil in oxidiert Form an Plasmaproteine gebunden zirkuliert.<sup>1,2,3,4</sup> Dabei liegen auch kleinere Mengen an reduziertem Homocystein und das Disulfid Homocystin (Hcy-SS-Hcy) vor. Die Gesamtkonzentration an Homocystein entspricht der Summe aller im Plasma bzw. im Serum gefundenen Hcy-Arten (frei und proteingebunden).

Hcy wird entweder zu Cystein oder zu Methionin metabolisiert. Auf dem Weg der Vitamin-B<sub>6</sub>-abhängigen Transsulfurierung wird Hcy irreversibel zu Cystein katabolisiert. Ein großer Teil des Hcy wird durch das Folat- und Cobalamin-abhängige Enzym Methionin-Synthase zu Methionin remethyliert. Hcy sammelt sich an und wird in das Blut ausgeschieden, sobald es zu einer Beeinträchtigung dieser Reaktionen kommt.<sup>2,4</sup>

Stark erhöhte Hcy-Konzentrationen werden bei Patienten mit **Homocystinurie** festgestellt. Dieses ist eine seltene genetische Störung der am Hcy-Metabolismus beteiligten Enzyme. Patienten mit Homocystinurie leiden an geistiger Retardierung, frühzeitiger Arteriosklerose sowie arterieller und venöser Thromboembolie.<sup>1,5</sup> Eine Hcy-Senkungstherapie verbessert die Prognose für diese Krankheit.<sup>5</sup>

Es gibt darüber hinaus auch andere, weniger schwere genetische Defekte, die zu mäßig erhöhten Hcy-Werten führen.<sup>6,7,8</sup>

In epidemiologischen Studien wurde der Zusammenhang zwischen den Hcy-Konzentrationen im Blut und **kardiovaskulären Erkrankungen (CVD)** untersucht. Im Ergebnis einer Metaanalyse von 27 dieser Studien unter Berücksichtigung von mehr als 4000 Patienten wurde eingeschätzt, dass ein Hcy-Anstieg von 5 µmol/l mit einer Odds-Ratio für CVD von 1,6 (bei Männern) bzw. 1,8 (bei Frauen) verbunden ist. Dieses ist vergleichbar mit der Odds-Ratio bei einem Cholesterinanstieg um 0,5 mmol/l (20 mg/dl). Darüber hinaus wurde auch ein starker Zusammenhang zwischen Homocystein Konzentration und peripherer arterieller Verschluss-krankheit deutlich.<sup>9</sup>

Bestimmte Patientengruppen mit Anämie und/oder Asthenie zeigen ebenfalls erhöhte Hcy-Werte in Plasma oder Serum.<sup>10,11</sup>

Bei Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen kommt es infolge arteriosklerotischer CVD zu einer übermäßigen Morbidität und Mortalität. Bei diesen Patienten wird häufig eine erhöhte Hcy-Konzentration im Blut beobachtet. Zwar herrscht bei diesen Patienten möglicherweise ein Mangel an den am Hcy-Metabolismus beteiligten Vitaminen, die erhöhten Hcy-Werte ergeben sich aber zumeist aus der gestörten Eliminierung des Homocysteins aus dem Blut durch die Nieren.<sup>12,13</sup>

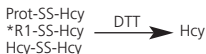
Medikamente wie Methotrexat, Carbamazepin, Phenytoin, Distickstoffoxid und Penicillin beeinträchtigen den Hcy-Metabolismus und können zu erhöhten Hcy-Werten führen.<sup>14,15</sup>

### Testprinzip

Der Axis® Homocysteine EIA ist ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Hcy-Konzentration im Blut.<sup>16</sup> Dabei wird proteingebundenes Hcy zu freiem Hcy reduziert und vor dem Immunoassay in einem separaten Vorgang enzymatisch zu S-Adenosyl-L-Homocystein (SAH) umgewandelt.<sup>17</sup> Das Enzym ist kennzeichnend für die L-Form des Homocysteins, der einzigen im Blut präsenten Form.

### Reduktion

Hcy, gemischtes Disulfid und proteingebundene Formen von Hcy werden in der Probe durch den Einsatz von Dithiothreitol (DTT) zu freiem Hcy reduziert.



\*R1: Thiolrückstände jeglicher Art.

### Enzymatische Umwandlung


Hcy wird in der Untersuchungsprobe durch die SAH-Hydrolase und das überschüssige Adenosin (Ad) zu S-Adenosyl-L-Homocystein umgewandelt.



Der folgende Festphasen-Immunoassay basiert auf der kompetitiven Reaktion um die Bindungsstellen eines monoklonalen Anti-SAH-Antikörpers zwischen dem SAH in der Probe und dem immobilisierten SAH, das an die Wände der Mikrotiterplatte gebunden ist. Nach dem Entfernen der ungebundenen Anti-SAH-Antikörper wird ein zweiter, mit Meerrettichperoxidase markierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, hinzugefügt. Nach dem Hinzufügen des Substrats wird die Peroxidaseaktivität durch ein spektrophotometrisches Verfahren gemessen, wobei sich die Absorption umgekehrt proportional zur Hcy-Konzentration in der Probe verhält.

### Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

1. **IVD** Nur zur Verwendung bei der *In-vitro*-Diagnose.
2. Das Reagenz D enthält 0,15 % Merthiolat ( $\leq 0,074$  % Quecksilber) und ist als „Gesundheitsschädlich“ klassifiziert. Bitte auf sachgerechten Umgang und ordnungsgemäße Entsorgung achten (siehe Abschnitt „Informationen zum sicheren Umgang mit den Produkten“).
3. 0,01 %-iges Merthiolat wird in einigen Reagenzien als Konservierungsstoff verwendet. Jeder D enthält weniger als 0,028 % Quecksilber. Bitte auf sachgerechten Umgang und ordnungsgemäße Entsorgung achten.
4. Das Reagenz F enthält Maus-Antikörper, und das Reagens G enthält Kaninchen-Antikörper.
5. Das Reagenz S enthält 0,8 M Schwefelsäure und ist als „Reizmittel“ klassifiziert. Bitte auf sachgerechten Umgang und ordnungsgemäße Entsorgung achten (siehe den Abschnitt „Informationen zum sicheren Umgang mit den Produkten“).

6. Die Kalibratoren, Kontrollen, das Reagenz A und das Reagenz E enthalten weniger als 0,10 % Natriumazid, das als Konservierungsstoff dient. Natriumazid kann bei Reaktion mit Blei- und Kupferrohrleitungen hochexplosive Metallazide bilden. Zur Vermeidung von Azidansammlungen deshalb die Leitungen bei der Entsorgung mit viel Wasser spülen.
7.  Die Kontrollpräparate enthalten aus Humanblutproben stammende Seren. Die Ausgangsmaterialien wurden mit negativem Ergebnis auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen (HBsAG), HIV-1-Antigen (HIVAg), HCV-Antikörper, HIV-1/2-Antikörper, HTLV-1/2-Antikörper und Hepatitis-B-Kernantikörper (HBc) getestet. Trotzdem sollte der Umgang mit Blutderivaten entsprechend den Empfehlungen für den Umgang mit infektiösem Material erfolgen. Die HHS-Publikation Nr. (CDC) 93-8395<sup>18</sup> bzw. lokale oder nationale Vorschriften zur Laborsicherheit sind anzuwenden.
8. Reagenzien mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht untereinander ausgetauscht werden.
9. Den Kit nach Ablauf des auf der Umverpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwenden.

### Bestandteile des Kits

**[REF]** FHCY100 Axis<sup>®</sup> Homocysteine EIA Kit, 96 Mulden.

Bestandteile des Kits	Lösung	Farbcode	Beschreibung der Komponenten	Volumen
<b>[REAG A]</b>	Assay-Puffer	Braun	Phosphatpuffer, Natriumazid	54 ml
<b>[REAG B]</b>	Adenosin/DTT	Weiß	Adenosin, Dithiothreitol, Citronensäure	3,5 ml
<b>[REAG C]</b>	SAH-Hydrolase	Weiß	Rinder-S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase, Trispuffer, Glycerol, Methylparaben	3,5 ml
<b>[REAG D]</b>	Enzyminhibitor	Orange	Merthiolat, Phosphatpuffer	55 ml
<b>[REAG E]</b>	Adenosindeaminase	Rot	Adenosindeaminase, Phosphatpuffer, Natriumazid, BSA, Farbstoff Phenolrot	55 ml
<b>[REAG F]</b>	a-SAH-Antikörper	Grün	Monoklonaler Maus-Anti-S-Adenosyl-L-Homocystein-Antikörper, BSA, Merthiolat	25 ml
<b>[REAG G]</b>	Enzymkonjugat	Blau	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper-Enzymkonjugat, BSA, Meerrettich-peroxidase, blauer Farbstoff	15 ml
<b>[REAG H]</b>	Substratlösung	Violett	N-Metyl-2-Pyrrolidon, Propylenglycol	15 ml
<b>[REAG S]</b>	Inhibitorlösung	Gelb	0,8 M Schwefelsäure	20 ml
<b>[BUF WASH]</b>	Waschpuffer	Schwarz	Phosphatpuffer, Merthiolat, Tween 20, BSA	60 ml
<b>[CAL 1] - [CAL 6]</b>	Kalibratoren	Weiß	S-Adenosyl-L-Homocystein (2, 4, 8, 15, 30, 50 µmol/l) in Puffer mit Konservierungsstoff	6 x 1,5 ml
<b>[MICROTITRE STRIPS]</b>	Mikrotiterstreifen	-	Beschichtet mit S-Adenosyl-L-Homocystein	12 x 8 Tests

**REF** FHCY200 Axis® Homocysteine EIA Kontroll Kit

Bestandteile des Kits	Code der Kappe	Beschreibung der Komponente	Volumen
<b>CONTROL L</b>	L	7,0 µmol/l Homocystein in verdünntem Humanserum, Phosphatpuffer und Konservierungsstoff	1,5 ml
<b>CONTROL M</b>	M	12,5 µmol/l Homocystein in verdünntem Humanserum, Phosphatpuffer und Konservierungsstoff	1,5 ml
<b>CONTROL H</b>	H	25,0 µmol/l Homocystein in verdünntem Humanserum, Phosphatpuffer und Konservierungsstoff	1,5 ml

Alle Kontrollpräparate sind anwendungsbereit.

**REF** FHCY050 Axis® Homocysteine EIA Wash Buffer

Bestandteile des Kits	Beschreibung der Bestandteile	Volumen
<b>BUF WASH</b>	Phosphatpuffer, Merthiolat, Tween 20, BSA	1000 ml

**BUF WASH** ist konzentriert und muss vor der Anwendung im Verhältnis 1 : 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden.

**Benötigte Materialien, die nicht im Kit enthalten sind:**

- Homocystein Kontrollen (nähere Informationen siehe unter „Qualitätskontrollen“)
- Kunststoff- oder Glasröhren zur Vorbehandlung der Proben
- Pipetten / Multipipetten 25 µl, 100 µl, 200 µl und 500 µl oder 8-Kanal-Multipipette für 100 µl und 200 µl
- Messkolben 50 ml und 600 ml
- Inkubator, 37 °C
- Waschflasche und Reader (450 nm) für Mikrotiterplatten

**Vorbereitung und Lagerung der Kit Komponenten**

1. Die Komponenten sollten kühl (2-8 °C) gelagert werden. Alle Flaschen aufrecht stehend und fest verschlossen aufbewahren. Die Komponenten sind bei vorschriftsmäßiger Aufbewahrung und Behandlung bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar. Nach dem Öffnen des Axis® Homocystein EIA sind die Einzelkomponenten 12 Wochen stabil, sofern sie bei 2-8 °C gelagert werden.
2. Die Vorbereitungslösung für die Probe ist durch Mischen der Reagenzien A, B und C herzustellen (siehe den Abschnitt „Vorgehensweise“). Die Vorbereitungslösung bleibt für eine Stunde stabil und muss für jeden Probenlauf frisch hergestellt werden.
3. Der Waschpuffer muss vor der Anwendung im Verhältnis 1 : 9 verdünnt werden. Der vorbereitete Waschpuffer ist bei Raumtemperatur (18-25 °C) 4 Wochen stabil.
4. Zum Schutz vor Lichteinwirkungen müssen die Reagenzien D und H in dunklen Flaschen aufbewahrt werden.
5. Es ist wichtig, dass die Mikrotiterstreifen trocken (also in dem versiegelten Beutel mit Trockenmittelkapseln) und kühl aufbewahrt werden. Nach der Entnahme aus dem Kühlschrank ist für mindestens zwei Stunden eine Anpassung an Raumtemperatur (18-25 °C) erforderlich. Dabei die Streifen nicht aus dem Beutel entnehmen.
6. Während des Probenlaufs sollte nur die erforderliche Anzahl Mikrotiter-Streifen im Rahmen aufbewahrt werden. Nicht verwendete Streifen in dem versiegelten Beutel mit Trocknungskapseln aufbewahren.
7. Den Kit nicht Temperaturen von über 37 °C aussetzen, da hierdurch die Enzyme denaturiert werden könnten.

## Probenentnahme und -lagerung

Im Axis® Homocysteine EIA Assay kann EDTA-Plasma oder Serum verwendet werden.

Da sich die Hcy-Synthese in den roten Blutkörperchen nach der Entnahme fortsetzt, sind die Proben unbedingt wie folgt zu behandeln:

- Vor der Zentrifugation und Trennung des Serum muss den Serumproben maximal 30 Minuten Zeit gegeben werden, damit sie gerinnen können. Vor der Trennung sind die Serumproben auf Eis aufzubewahren.
- EDTA-Plasmaproben müssen unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert oder auf Eis gelegt werden. EDTA-Plasmaproben können vor der Trennung durch Zentrifugation für bis zu 6 Stunden auf Eis gelagert werden.

Die Konzentration des zirkulierenden Homocystein kann durch die Nahrungsaufnahme verändert werden. Proteinreiche Mahlzeiten erhöhen die Homocysteinwerte und sind am Nachmittag vor dem Tag der Probenentnahme zu vermeiden.<sup>19, 20</sup>

Aufgrund der oben genannten Einflussfaktoren ist die Anwendung standardisierter Verfahren der Probenentnahme von entscheidender Bedeutung. Die aufgetauten Proben müssen vor der Verwendung gründlich durchgemischt werden.

Plasma- oder Serumproben sind 12 Wochen bei 2-8 °C, bis zu 3 Wochen bei Zimmertemperatur (18-25 °C) und mindestens 8 Monate bei -20°C stabil.

## Einschränkungen

- Wenn eine automatische Pipettierstation verwendet wird, kann nach dem Zusetzen des blauen Reagenz G ein gründliches Durchspülen der Schläuche erforderlich sein ( vorzugsweise mit verdünnter Säure und danach mit Wasser). Lösungsrückstände in den Schläuchen würden den nächsten Assay-Schritt, das Hinzufügen der Reagenz H beeinträchtigen.
- Das Waschverfahren ist für die gewünschte Exaktheit der Ergebnisse von entscheidender Bedeutung. Falls ein manuelles Waschen erforderlich ist, besser viermal 350 µl statt dreimal 400 µl einsetzen. Nach dem Waschen die Vertiefungen auf Papiertüchern leeren und ausklopfen.
- Den Kit nicht Temperaturen von über 37 °C aussetzen, da hierdurch die Enzyme denaturiert werden könnten.
- Bei Proben von Patienten, die sich einer medikamentösen Behandlung unter Verabreichung von S-Adenosyl-Methionin unterziehen, werden unter Umständen fälschlicherweise erhöhte Homocysteinkonzentrationen angezeigt.
- Proben von Patienten, denen aus diagnostischen oder therapeutischen Gründen Präparate mit monoklonalen Maus-Antikörpern verabreicht wurden, können humane Antimaus-Antikörper (HAMA) enthalten. In Serum- oder Plasmaproben enthaltene HAMA können Immunoassays beeinträchtigen, bei denen monoklonale Maus-Antikörper zum Einsatz kommen. Diese Proben dürfen nicht mit dem Axis® Homocysteine EIA Assay bestimmt werden.
- Proben von Patienten, die Methotrexat, Carbamazepin, Phenytoin, Distickstoffoxid, Antikonvulsiva oder 6-Azauridinriacetat verabreicht bekommen, können aufgrund metabolischer Wechselwirkungen mit dem Homocysteinmetabolismus erhöhte Homocysteinwerte aufweisen.

## Testdurchführung

Überzeugen Sie sich vor der Verwendung davon, dass alle Lösungen und Mikrotiterstreifen Zimmertemperatur angenommen haben. Es ist zu empfehlen, den Kit vor dem Einsatz über Nacht bei Raumtemperatur aufzubewahren. Wir empfehlen, die Kalibratoren in jedem Lauf in Doppelbestimmung mitzuführen.

## Vorbehandlung der Proben

1. Die Vorbereitungslösung muss innerhalb einer Stunde vor dem Beginn des Assays angesetzt werden. Für 10 Proben (ohne Totvolumina) werden folgende Volumina benötigt:

4,5 ml **REAG A**

0,25 ml **REAG B**

0,25 ml **REAG C**

Mischen.

2. Die Kalibratoren und die Proben/Kontrollen in Kunststoff- oder Glasröhrchen wie folgt verdünnen:

25 µl Kalibrator/Probe/Kontrolle

+ 500 µL Vorbereitungslösung

Gut durchmischen.

30 Minuten bei 37 °C inkubieren (Während der Inkubation die Röhrchen mit Kappen verschließen oder mit Parafilm abdecken).

Hinweis: Mit dem Schritt 3 vor dem Abkühlen der Proben fortfahren.

3. 500 µl **REAG D** hinzufügen.  
Gut durchmischen.  
15 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.

4. 500 µl **REAG E** hinzufügen.  
Gut durchmischen.  
5 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.

## Verfahrensweise für die Mikrotiterplatten

5. 25 µl verdünnte(n) Kalibrator / Probe / Kontrolle aus Schritt 4 in die Vertiefungen der mit den SAH-beschichteten Mikrotiterstreifen pipettieren.
6. Zu jeder Vertiefung 200 µl **REAG F** hinzufügen.  
30 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.  
Bei allen Inkubationsschritten den beiliegenden Deckel verwenden.
7. Mit verdünntem Waschpuffer (**BUF WASH** + gereinigtes Wasser) waschen.  
Dazu dreimal 400 µl Puffer verwenden. Falls manuelles Waschen erforderlich ist, besser viermal 350 µl statt dreimal 400 µl verwenden. Nach dem Waschen die Vertiefungen auf Papiertüchern leeren und ausklopfen.
8. Zu jeder Vertiefung 100 µl **REAG G** hinzufügen.  
20 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.
9. Mit verdünntem Waschpuffer (**BUF WASH** + gereinigtes Wasser) waschen.  
Dazu dreimal 400 µl Puffer verwenden. Falls manuelles Waschen erforderlich ist, besser viermal 350 µl statt dreimal 400 µl verwenden. Nach dem Waschen die Vertiefungen auf Papiertüchern leeren und ausklopfen.
10. Zu jeder Vertiefung 100 µl **REAG H** hinzufügen.  
10 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.
11. Zu jeder Vertiefung 100 µl **REAG S** hinzufügen.

12. Schütteln und das Ergebnis innerhalb von 15 Minuten bei 450 nm ablesen (Um ein ordnungsgemäßes Durchmischen zu gewährleisten, ist die Verwendung eines automatischen Plattenschüttlers zu empfehlen).

### Interpretation der Ergebnisse

Bei der Interpretation sind alle anderen Testergebnisse und der klinische Status des Patienten zu berücksichtigen.

Wir empfehlen bei der Erstellung der Kalibrationskurve und der Berechnung von Werten unbekannter Proben eine 4 Parameter Logistik Funktion einzusetzen.

### Qualitätskontrolle

Wir empfehlen Labors die Verwendung einer Homocystein-Kontrolle mit bekannter Konzentration. Axis-Shield bietet ein Set von Kontrollen mit niedriger, mittlerer und hoher Konzentration an.

( REF FHCY200).

Die Kontrollen enthalten L-Homocystein in aufbereitetem Humanserum folgender Konzentrationen:

Kontrollpräparat	Mittlerer Hcy-Gehalt ( $\mu\text{mol/l}$ )	Hcy-Bereich ( $\mu\text{mol/l}$ )
<b>CONTROL L</b>	7,0	5,6 – 8,4
<b>CONTROL M</b>	12,5	10,0 – 15,0
<b>CONTROL H</b>	25,0	20,0 – 30,0

### Referenzbereich

Der Referenzbereich sollte von jedem Labor bestimmt werden, um die Charakteristika der getesteten Population zu bestätigen. Vor der Analyse einer ausreichenden Anzahl von Proben durch das Labor und damit der Ermittlung eines eigenen Referenzbereiches können die folgenden Daten als Referenzpunkte verwendet werden.

Die Hcy-Konzentration im Plasma oder Serum gesunder Menschen schwankt je nach Alter, Geschlecht, geographischem Gebiet und genetischen Faktoren. In der wissenschaftlichen Literatur werden für männliche und weibliche Erwachsene Referenzwerte zwischen 5 und 15  $\mu\text{mol/l}$  genannt, wobei Männer höhere Werte als Frauen aufweisen und die Werte bei Frauen nach der Menopause höher als vor der Menopause sind.<sup>21, 22, 23</sup> Mit höherem Alter nehmen die Hcy-Werte in der Regel zu, so dass der Referenzbereich für ältere Menschen (> 60 Jahre) bei 5 - 20  $\mu\text{mol/l}$  liegt.<sup>24</sup> In Ländern, in denen eine Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Folsäure üblich ist, können niedrigere Hcy-Werte beobachtet werden.<sup>25, 26</sup>

Proben von 382 Männern und Frauen (100 Skandinavien; 54 Männer im Alter zwischen 30 und 60 Jahren, 46 Frauen im Alter zwischen 29 und 70 Jahren. 185 Hispanics; vor allem Männer im Alter zwischen 20 und 65 Jahren. 97 Amerikaner; 54 Männer im Alter zwischen 16 und 74 Jahren, 43 Frauen im Alter zwischen 15 und 79 Jahren), offensichtlich gesund, ohne Angaben zu aktuellen Medikationen, zum Krankheitsstatus oder zu bekannten Risikobedingungen für eine erhöhte Homocysteinkonzentration wurden unter Verwendung des Axis® Homocysteine EIA getestet. Der Mittelwert der Homocysteinkonzentration betrug unter Skandinaviern 8,4  $\mu\text{mol/l}$ , unter Hispanics 8,9  $\mu\text{mol/l}$  und unter Amerikanern 9,3  $\mu\text{mol/l}$ . Der Homocystein-Referenzbereich lag auf der Grundlage einer 95 %-igen Vertrauensgrenze bei der skandinavischen Population bei 5-15  $\mu\text{mol/l}$ , bei der amerikanischen Population bei 3,6-15,0  $\mu\text{mol/l}$  und bei der hispanischen Population bei 2,9-16,0  $\mu\text{mol/l}$ .

### Messbereich

Der Kalibratorbereich liegt zwischen 2 und 50  $\mu\text{mol/l}$ .

## Leistungsdaten

### Präzision des Assays

Die Präzision des Axis® Homocystein-EIA-Tests wurde nach dem NCCLS-Protokoll EP5-T2 geprüft. Dazu wurden Kontrollen in drei Konzentrationen 20 Tage lang mit 4 Replikaten pro Durchlauf und Konzentration getestet. In der Tabelle 1 sind die Präzisionsdaten zusammengefasst.

**Tabelle 1: Präzision**

Proben	Hcy-Durchschnitt µmol/l	Intra-Assay- Präzision	Präzision insgesamt
Geringe Konz.	6,1	8 %	10 %
Mittlere Konz.	10,5	7 %	9 %
Hohe Konz.	20,6	8 %	10 %

### Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (CV < 20 %) liegt bei 1,0 µmol/l.

### Linearität verdünnter Plasmaproben

Liegt die Homocysteinkonzentration einer Probe oberhalb des Messbereiches liegt, sollte die Probe mit Reagenz A verdünnt und erneut analysiert werden.

Die Linearität wurde anhand von vier hochkonzentrierten Patientenproben mit unterschiedlichen Mengen des Reagenz A als Verdünnungsmittel überprüft.

Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse:

Neigung: 0,98

Achsenabschnitt: -0,4 µmol/l

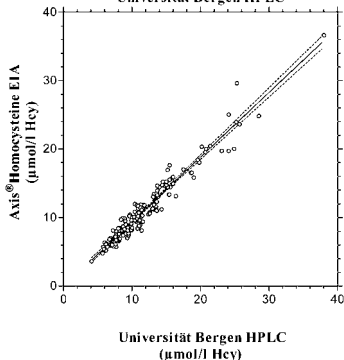
Korrelationskoeffizient  $r^2$ : 0,99

### Methodenvergleich

Der Axis® Homocysteine EIA wurde mit der HPLC-Methode der Universität Bergen verglichen.<sup>27</sup>

Bei einem Vergleich von 164 Patientenproben mit einer Homocysteinkonzentration zwischen 3 und 37 µmol/l ergab sich die in Abbildung 1 dargestellte lineare Regression.

Axis® Homocysteine EIA vs  
Universität Bergen HPLC



Neigung: 0.94  
Achsenabschnitt: - 0.09 µmol/l  
Korrelationskoeffizient ( $r^2$ ): 0.94

**Abbildung 1: Methodenvergleich**

### Störsubstanzen

Plasmaproben wurde Bilirubin, Hämoglobin, Lipide, rote Blutkörperchen, Protein und Natriumfluorid zugesetzt, um die Abweichung der mit Axis® Homocysteine EIA ermittelten Ergebnisse zu ermitteln. Der Assay zeigte bei folgenden Konzentrationen eine Abweichung von unter 10 %:

Bilirubin (0,5 g/l), Haemoglobin (10 g/l), Triglyceride (10 g/l), rote Blutkörperchen (5,0 % v/v), Protein (80 g/l) und Natriumfluorid (10 g/l).

### Kreuzreaktivität

Für Stoffgemische, die mit dem Axis® Homocysteine EIA Assay interferieren könnten, wurde die Kreuzreaktivität getestet. Der Assay ergab eine 16 %-ige Kreuzreaktivität unter Anwesenheit von S-Adenosyl-L-Methionin (0,5 mmol/l) und eine unter 1 % liegende Kreuzreaktivität unter Anwesenheit von: Adenosin (5,0 mmol/l), Cystathionin (0,5 mmol/l), L-Cystein (100 mmol/l), Gluthathion (100 mmol/l) und Thiolacton (0,5 mmol/l).

### Informationen zum sicheren Umgang mit den Produkten

**REAGD**



R-20/21/22 Gefährlich bei Inhalation, Hautkontakt und Verschlucken.

R-33 Gefahr kumulativer Effekte.

S-24 Hautkontakt vermeiden.

S-28 Nach Hautkontakt sofort mit reichlich Wasser abspülen.

S-36/37/39 Geeignete Schutzkleidung, Handschuhe sowie Augen- und Gesichtsschutz tragen.

**REAGS**

R-36/38 Wirkt augen- und hautreizend.

S-25 Augenkontakt vermeiden.

S-26 Bei Augenkontakt sofort mit reichlich Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.

S-37/39 Geeignete Handschuhe sowie Augen- und Gesichtsschutz tragen.

## References

1. Malinow, MR. Plasma homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases: A mini-review. *Clin Chem* 1995;41:173-176.
2. Ueland PM. Homocysteine species as components of plasma redox thiol status. *Clin Chem* 1995;41:340-342.
3. Perry IJ, Refsum H, Morris RW, Ebrahim SB, Ueland PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *The Lancet* 1995;346:1395-1398.
4. Finkelstein JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem* 1990;1:228-237.
5. Mudd SH, Levy HL, Skovby F. Disorder of transsulfuration. In: C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, et al. eds. *The metabolic basis of inherited disease* New York: McGraw-Hill; 1995:1297-1327.
6. Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I. Hyperhomocysteinemia: An independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* 1991;324:1149-1155.
7. Deloughery TG, Evans A, Sadeghi A, McWilliams J, Henner WD, Taylor LM Jr, Press RD. Common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Correlation with homocysteine metabolism and late-onset vascular disease. *Circulation* 1996;94:3074-3078.
8. Schmitz C, Lindpaintner K, Verhoef P, Gaziano JM, Buring J. Genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and myocardial infarction. *Circulation* 1996;94:1812-1814.
9. Boushey CJ, Beresford SAA, Omenn GS, Motulsky AG. A Quantitative Assessment of Plasma Homocysteine as a Risk Factor for Vascular Disease, *JAMA* 1995;274:1049-1057.
10. Allen, RH, Stabler SP, Savage DG, Lindenbaum J. Diagnosis of cobalamin deficiency I: Usefulness of serum methylmalonic acid and total homocysteine concentrations, *Am J Hematol* 1990;34:90-98
11. Stabler, SP, Lindenbaum J, Allen RH. The Use of homocysteine and other metabolites in the specific diagnosis of vitamin B-12 deficiency, *J Nutr* 1996;126: 1266S-1272S.
12. Guttormsen AB, Svarstad E, Ueland PM, Refsum H. Elimination of homocysteine from plasma in subjects with end-stage renal failure. *Irish J Med Sci* 1995;164 (Suppl. 15):8-9
13. Bostom AG, Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: Prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997;52:10-20.
14. Desouza C, Keebler M, McNamara DB, Fonseca V. Drugs affecting homocysteine metabolism. *Review. Drugs* 2002;62 (4):605-616.
15. Refsum H, Ueland PM. Clinical significance of pharmacological modulation of homocysteine metabolism. *Review. Trends Pharmacol Sci* 1990;11:411-416
16. Frantzen F, Faaren AL, Alfheim I, Nordhei AK. An enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum. *Clin Chem* 1998;44:311-316.
17. Sundrehagen E. Axis Biochemicals ASA. Enzymatic assay for homocysteine and a kit therefor. EP 623174/US5631127.
18. US Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication No. (CDC) 93-8395. Washington, DC: US Government Printing Office, May 1999 (4th edition).
19. Ubbink JB, Vermaak Hayward WJ, van der Merwe A, Becker PJ. The effect of blood sample aging and food consumption on plasma total homocysteine levels. *Clinica Chimica Acta* 1992;207:119-128.
20. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiol compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994;124:1934-1941.
21. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow R, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: Methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993;39:1764-1779.
22. Nehler MR, Taylor LM Jr, Porter JM. Homocysteine as a risk factor for atherosclerosis: A review. *Cardiovasc Pathol* 1997;6:1-9.

23. Lussier-Cacan S, Xhignesse M, Piolot A, Selhub J, Davignon J, Genest J Jr. Plasma total homocysteine in healthy subjects: sex-specific relation with biological traits. *Am J Clin Nutr* 1996; 64:587-593.
24. Clarke R, Woodhouse P, Ulvik A, Frost C, Sherliker P, Refsum H, Ueland PM, Khaw K- T. Variability and determinants of total homocysteine concentrations in plasma in an elderly population. *Clin Chem* 1998;44:102-107.
25. Jacques PF, Selhub J, Bostom AG, Wilson PWF, Rosenberg IH. The effect of folic acid fortification on plasma folate and total homocysteine concentrations. *N Engl J Med* 1999;340:1449-1454.
26. Lawrence JM, Pettitt DB, Watkins M, Umekubo MA. Trends in serum folate after food fortification. *Lancet* 1999;354:915-916.
27. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM. Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1993;39:263-271.