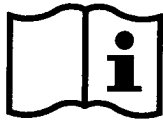


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Homocysteine ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of total L homocysteine in human serum or plasma



DE2925



96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
 Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
 Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
 Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

1	INTENDED USE	3
2	SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	3
3	ASSAY PRINCIPLE	3
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
5	KIT COMPONENTS	4
6	PREPARATION AND STORAGE OF KIT COMPONENTS	5
7	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	6
8	LIMITATIONS	6
9	PROCEDURE	6
10	INTERPRETATION OF RESULTS	7
11	QUALITY CONTROL	7
12	REFERENCE RANGE	7
13	MEASURING RANGE	8
14	PERFORMANCE DATA	8
15	PRODUCT SAFETY INFORMATION	8
1	VERWENDUNGSZWECK	9
2	ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG DES TESTS	9
3	TESTPRINZIP	9
4	VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE	10
5	BESTANDTEILE DES KITS	11
6	VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER KIT KOMPONENTEN	12
7	PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG	12
8	EINSCHRÄNKUNGEN	13
9	TESTDURCHFÜHRUNG	13
10	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	14
11	QUALITÄTSKONTROLLE	14
12	REFERENZBEREICH	15
13	MESSBEREICH	15
14	LEISTUNGSDATEN	15
15	INFORMATIONEN ZUM SICHEREN UMGANG MIT DEN PRODUKTEN	16
1	USO PREVISTO	17
2	RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST	17
3	PRINCIPIO DEL PROCEDIMENTO	17
4	AVVERTENZE E PRECAUZIONI	18
5	COMPONENTI DEL KIT	18
6	PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI COMPONENTI DEL KIT	19
7	RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	20
8	LIMITAZIONI	20
9	PROCEDURA	21
10	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	22
11	CONTROLLO DI QUALITÀ	22
12	INTERVALLO DI VALORI DI RIFERIMENTO	22
13	INTERVALLO DI MISURAZIONE	22
14	DATI RELATIVI ALLE PRESTAZIONI	22
15	INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA DEL PRODOTTO	23
16	REFERENCES / LITERATURE	24
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	26

1 INTENDED USE

The Homocysteine ELISA is intended for the quantitative determination of total L-homocysteine in human serum or plasma. The device can assist in the diagnosis and treatment of patients suspected of having hyperhomocysteinemia and homocystinuria.

2 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Homocysteine (Hcy) is a thiol-containing amino acid produced by the intracellular demethylation of methionine. Hcy is exported into plasma where it circulates mostly in its oxidized forms bound to plasma proteins.[1, 2, 3, 4] Smaller amounts of reduced homocysteine and disulfide homocystin (Hcy-SS-Hcy) are present. Total homocysteine represents the sum of all Hcy species found in plasma and serum (free plus protein-bound).

Hcy is either metabolised to cysteine or to methionine. In the vitamin B₆ dependent transsulphuration pathway Hcy is irreversibly catabolised to cysteine. A major part of Hcy is remethylated to methionine, mainly by the folate and cobalamin- dependent enzyme methionine synthase. Hcy accumulates and is excreted into the blood when these reactions are impaired. [2,4]

Severely elevated concentrations of Hcy are found in subjects with homocystinuria, a rare genetic disorder of the enzymes involved in the metabolism of Hcy. Patients with homocystinuria exhibit mental retardation, early arteriosclerosis and arterial and venous thromboembolism.[1, 5] Hcy reducing therapy improves the prognosis for this disease.5 Other less severe genetic defects which lead to moderately elevated levels of Hcy are also found.[6, 7,8]

Epidemiological studies have investigated the relationship between Hcy levels in blood and cardiovascular disease (CVD). A meta analysis of 27 epidemiological studies, including more than 4000 patients, estimated that a 5 µmol/L increase in Hcy was associated with an odds ratio for coronary artery disease (CAD) of 1.6 for men and 1.8 for women, or the same that is associated with 0.5 mmol/L (20 mg/dL) increase in cholesterol. Peripheral arterial disease also showed a strong association.[9]

Certain patient groups with anemia and/or asthenia also demonstrate increased levels of plasma- or serum Hcy. [10,11]

Patients with chronic renal disease experience an excess morbidity and mortality due to arteriosclerotic CVD. Elevated concentration of Hcy is a frequently observed finding in the blood of these patients. Although such patients may lack some of the vitamins involved in the metabolism of Hcy, the increased levels of Hcy are mainly due to impaired removal of Hcy from the blood by the kidney.[12, 13]

Drugs such as methotrexate, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide and penicillamine interfere with the Hcy metabolism and may give elevated levels of Hcy.[14, 15]

3 ASSAY PRINCIPLE

The Homocysteine ELISA is an enzyme immunoassay for the determination of Hcy in blood.[16] Protein-bound Hcy is reduced to free Hcy and enzymatically converted to S-adenosyl-L-homocysteine (SAH) in a separate procedure prior to the immunoassay.[17] The enzyme is specific for the L-form of homocysteine, which is the only form present in the blood.

Reduction

Hcy, mixed disulfide and protein-bound forms of Hcy in the sample are reduced to free Hcy by use of dithiothreitol (DTT).



Enzymatic conversion

Hcy in the test sample is converted to S-adenosyl-L-homocysteine by the use of SAH hydrolase and excess adenosine (Ad).



The following solid-phase enzyme immunoassay is based on competition between SAH in the sample and immobilised SAH bound to the walls of the microtitre plate for binding sites on a monoclonal anti-SAH antibody. After removal of unbound anti-SAH antibody, a secondary rabbit anti-mouse antibody labelled with the enzyme horse radish peroxidase (HRP) is added. The peroxidase activity is measured spectrophotometrically after addition of substrate, and the absorbance is inversely related to the concentration of Hcy in the sample.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. For in-vitro Diagnostic Use Only.
2. Reagent D contains 0.15% merthiolate ($\leq 0.074\%$ mercury), and is classified as "Harmful". Please handle and dispose of properly (See section "Product Safety Information").
3. 0.01% merthiolate is used as preservative in some reagents. Each kit contains less than 0.028% mercury. Please handle and dispose of appropriately.
4. Reagent F contains mouse antibodies and Reagent G contains rabbit antibodies.
5. Reagent S contains 1.6 N acidic solution, and is classified as "Irritant". Please handle and dispose of properly (See section "Product Safety Information").
6. Calibrators, Controls, Reagent A and Reagent E contain less than 0.10% sodium azide as preservative. Sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, flush with a large volume of water to prevent azide build-up.
7. Controls contain sera originating from human blood samples. The source materials have been tested and found to be negative for Hepatitis B Surface Antigen (HBsAG), HIV-1 Antigen (HIVAg), HCV antibody, HIV-1/2 antibody, HTLV-1/2 antibody and Hepatitis B core Antibody (HBc). However, blood derivatives should be handled according to recommended procedures for handling infectious material. HHS publication no. (CDC) 93-8395 [18] or local/national guidelines on laboratory safety procedures should be consulted.
8. Reagents with different lot numbers must not be interchanged.
9. Do not use the kit after the expiration date on the outer box.

5 KIT COMPONENTS

Homocysteine ELISA Kit, 96 wells

Kit Components	Solution	Component Description	Volume
[REAG A] / BUF	Assay Buffer	Phosphate buffer, sodium azide	54 mL
[REAG B] / ADENO DTT	Adenosine/DTT	Adenosine / dithiothreitol, citric acid	3.5 mL
[REAG C] / SAH HYDROL	SAH-hydrolase	Recombinant S-adenosyl-L-homocysteine hydro- lase, trisbuffer, glycerol, methylparaben	3.5 mL
[REAG D] / ENZ INH	Enzyme Inhibi- tor	Merthiolate, phosphate buffer	55 mL
[REAG E] / ADENO DEAM	Adenosine de- aminase	Adenosine deaminase, phosphate buffer, sodium azide, BSA, phenol-red dye	55 mL
[REAG F] / SAH Ab	a-SAH Antibody	Monoclonal mouse-anti-S-adenosyl-L- homocysteine antibody, BSA, merthiolate	25 mL
[REAG G] / ENZ CONJ	Enzyme Conju- gate	Rabbit anti-mouse-antibody enzyme conjugate, BSA, horse radish peroxidase, blue dye	15 mL
[REAG H] / SUB TMB	Substrate Solu- tion	N-methyl-2-pyrrolidon, propyleneglycol	15 mL
[REAG S] / STOP SOLN	Stop Solution	1.6 N acidic solution	20 mL
BUF WASH 10x	Wash Buffer	Phosphate buffer, merthiolate, Tween 20, BSA	60 mL
CAL 1 - 6	Standards	S-adenosyl-L-homocysteine (2, 4, 8, 15, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$) in buffer with preservative	6 x 1.5 mL
SORB MT	Microtiter wells	Coated with S-adenosyl-L-homocysteine	12 x 8 wells

BUF WASH 10x is concentrated and must be diluted (1+9) with purified water before use.
All other components are ready to use.

Homocysteine ELISA Control kit (DE3329)

Kit Components	Component Description	Volume
[CONTROL L]	7.0 µmol/L homocysteine in diluted serum samples of human origin, phosphate buffer and preservative	1.5 mL
[CONTROL M]	12.5 µmol/L homocysteine in diluted serum samples of human origin, phosphate buffer and preservative	1.5 mL
[CONTROL H]	25.0 µmol/L homocysteine in diluted serum samples of human origin, phosphate buffer and preservative	1.5 mL

All controls are ready to use.

Homocysteine ELISA Wash Buffer

Kit Components	Component Description	Volume
BUF WASH 10x	Phosphate buffer, merthiolate, Tween 20, BSA	1000 mL

BUF WASH 10x is concentrated and must be diluted (1+9) with purified water before use.

5.1 Materials required but not provided in the kit:

- Homocysteine controls (see section “Quality Controls” for more information)
- Plastic or glass tubes for pre-treatment of samples
- Pipettes / multipipettes 25 µL, 100 µL, 200 µL and 500 µL or 8 channel multipipette for 100 µL and 200 µL
- Volumetric flask 50 mL and 600 mL
- Incubator, 37 °C
- Washer and reader (450 nm) for microtiter plates

6 PREPARATION AND STORAGE OF KIT COMPONENTS

- Components should be stored refrigerated (2 - 8 °C). Store all bottles upright and tightly capped. The components are stable until the stated expiration date when stored and handled as directed. Once the components in the Homocysteine ELISA Kit are opened they are stable for 12 weeks when stored at 2-8 °C.
- The sample pre-treatment solution has to be made by mixing Reagent A, B and C (see Section “Procedure”). The solution is stable for one hour and has to be freshly made for each run.
- The Wash Buffer must be diluted (1+9) with distilled water before use. The prepared Wash buffer is stable for 4 weeks when stored at room temperature (18-25 °C).
- Reagent D and H are stored in dark bottles to avoid exposure to light.
- It is important that the microtiter strips are kept dry, i.e. in the sealed bag with drying capsules, and stored refrigerated. Equilibration for a minimum of two hours is required to reach room temperature (18-25 °C). Leave the strips in the bag during equilibration.
- Only the necessary number of microtiter strips should be kept in the frame during the run. Unused strips should be kept in the sealed bag with drying capsules.
- Avoid exposure of the kit to temperatures exceeding 37 °C as this may denature the enzymes.

7 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

EDTA-plasma or serum may be used with the Homocysteine ELISA assay.

As synthesis of Hcy continues in red blood cells after drawing, it is very important to prepare specimens as follows:

- Serum samples should be allowed to clot for no more than 30 minutes before centrifugation and separation of serum. Serum samples should be kept on ice prior to separation.
- EDTA-plasma samples must be centrifuged or put on ice immediately after drawing. EDTA-plasma samples may be kept on ice for up to 6 hours prior to separation by centrifugation.

Food consumption can affect circulating homocysteine levels. Protein rich meals give higher homocysteine values and should be avoided late in the day before sampling.[19, 20]

Standardised sampling procedures are crucial due to the above mentioned influencing factors. Complete mixing of thawed samples is required before use.

Plasma or serum samples may be stored for 12 weeks at 2 - 8 °C, for up to 3 weeks at room temperature (18 - 25 °C) and have been shown to be stable for at least 8 months if frozen at minus 20 °C.

8 LIMITATIONS

- If an automatic pipetting station is used, thorough washing of the tubing after addition of the blue coloured Reagent G may be needed - preferably with diluted acid followed by water. Any remaining solution in the tubing will interfere with the next assay step; i.e. addition of Reagent H.
- The washing procedure is critical for obtaining good precision. If manual washing is required, use 4 times 350 µL instead of 3 times 400 µL. After washing, empty the wells on paper towels.
- Avoid exposure of the kit to temperatures exceeding 37 °C as this may denature the enzymes.
- Specimens from patients who are on drug therapy involving S-adenosyl-methionine may show falsely elevated levels of homocysteine.
- Specimens from patients who have received preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis or therapy may contain human anti-mouse antibody (HAMA). HAMA, present in serum or plasma specimens, may interfere in immunoassays which utilise mouse monoclonal antibodies. These specimens should not be assayed with the Homocysteine ELISA assay.
- Specimens from patients taking methotrexate, carbamazepine, phenytoin, nitrous oxide, anti-convulsants or 6-azauridine triacetate, may have elevated levels of homocysteine due to metabolic interference with the homocysteine metabolism.

9 PROCEDURE

Make sure all solutions and microtiter strips are equilibrated to room temperature before use. Leaving the kit at room temperature over night is recommended. We recommend running the standards in duplicate and to performing a new calibration curve for each run to avoid run-to-run variations using coated microtiter plates.

9.1 Sample pre-treatment procedure

1. Sample pre-treatment solution must be made up no more than 1 hour prior to the start of the assay. Volume needed per 10 samples (no dead volume calculated):
4.5 mL REAG A
0.25 mL REAG B
0.25 mL REAG C
Mix.
 2. Dilute calibrators and samples/controls in plastic or glass tubes as follows:
25 µL standard/sample/control
+ 500 µL sample pre-treatment solution
Mix well.
Incubate for 30 minutes at 37 °C (Cap the tubes or cover with parafilm during incubation).
- Note:** Proceed with step 3 before the samples have cooled.
3. Add 500 µL REAG D
Mix well.
 4. Incubate for 15 minutes at 18-25 °C.
 5. Add 500 µL REAG E
Mix well.
 6. Incubate for 5 minutes at 18-25 °C.

9.2 Microtitre plate procedure

7. Pipette 25 µL diluted calibrator / sample / control from step 4 into the wells of the SAH-coated microtitre strips.
8. Add 200 µL REAG F to each well.
9. Incubate for 30 min at 18-25 °C.
Use the enclosed lid during all incubations.
10. Wash with diluted Wash buffer.
Use 3 x 400 µL. If manual washing is required, use 4 times 350 µL instead of 3 times 400 µL. After washing, empty the wells on paper towels.
11. Add 100 µL REAG G to each well.
12. Incubate for 20 min at 18-25 °C.
13. Wash with diluted Wash buffer.
Use 3 x 400 µL. If manual washing is required, use 4 times 350 µL instead of 3 times 400 µL. After washing, empty the wells on paper towels.
14. Add 100 µL REAG H to each well.
15. Incubate for 10 min at 18-25 °C.
16. Add 100 µL REAG S to each well.
17. Shake and read at 450 nm within 15 minutes (Automatic plate shaker is preferred to ensure proper mixing).

10 INTERPRETATION OF RESULTS

Results should be interpreted considering all other test results and the clinical status of the patient. We recommend that a four parameter logistic curve fit is used for preparing the calibration curve and calculation of unknown samples.

11 QUALITY CONTROL

We recommend that each laboratory use a homocysteine control with known value. DEMEDITEC provides a set of low, medium and high controls, (REF DE3329). The controls contain L-homocysteine in processed human serum at the following concentrations:

Control	Mean value Hcy (µmol/L)	Range Hcy (µmol/L)
Low	7.0	5.6 - 8.4
Medium	12.5	10.0 – 15.0
High	25.0	20.0 – 30.0

12 REFERENCE RANGE

The reference range should be determined by each laboratory to confirm the characteristics of the population being tested. As a point of reference, the following data may be used until the laboratory has analysed a sufficient number of samples to determine its own reference range.

The Hcy concentration in plasma or serum of healthy individuals varies with age, gender, geographical area and genetic factors. 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 women having higher homocysteine values than pre menopausal women.[21, 22, 23] Hcy values will normally increase with age, giving a reference range among an elderly population (> 60 years) of 5 - 20 µmol/L.[24] In countries with folic acid fortification programmes, reduced levels of Hcy may be observed.[25, 26]

Samples from 382 males and females (100 Scandinavians; 54 males aged 30 - 60, 46 females aged 29 - 70. 185 Hispanics; predominantly males aged 20 - 65. 97 Americans; 54 males aged 16 - 74, 43 females aged 15 - 79), apparently healthy, without information on current medications, disease states or known risk conditions for elevated homocysteine, were tested using the Homocysteine ELISA.

The median value of the homocysteine concentration among Scandinavians was 8.4 µmol/L, among Hispanics 8.9 µmol/L and among Americans 9.3 µmol/L.

The homocysteine reference range was established based on 95% confidence limits as 5 - 15 µmol/L for the Scandinavian population, 3.6 - 15.0 µmol/L for the American population and 2.9 - 16.0 µmol/L for the Hispanic population.

13 MEASURING RANGE

The calibrator range is from 2 to 50 µmol/L.

14 PERFORMANCE DATA**14.1 Assay Precision**

Precision of the Homocysteine ELISA was evaluated according to NCCLS Protocol EP5-T2. Three levels of controls were assayed for 20 days with 4 replicates per run at each level. Precision data are summarised in

Samples	Average Hcy µmol/L	Within run precision	Total precision
Control Low	6.1	8 %	10 %
Control Medium	10.5	7 %	9 %
Control High	20.6	8 %	10 %

14.2 Limit of quantification

The quantification limit (CV < 20%) is 1.0 µmol/L.

14.3 Linearity of diluted plasma samples

If the homocysteine concentration of a sample exceeds the range of the calibration curve, the sample should be diluted with Reagent A and reanalysed.

The linearity was evaluated by diluting four high patient samples with varying amounts of Reagent A as diluent.

Linear regression analysis gave: Slope: 0.98
Intercept: - 0.4 µmol/L
Correlation coefficient r^2 : 0.99

14.4 Method Comparison

The Homocysteine ELISA was compared to the University of Bergen HPLC method.[27]

A comparison of 164 patient samples ranging from 3 - 37 µmol/L homocysteine gave the linear regression:

Slope: 0.94
Intercept: - 0.09 µmol/L
Correlation coefficient r^2 : 0.94

14.5 Interfering Substances

Bilirubin, haemoglobin, lipids, red blood cells, protein and sodium fluoride were spiked into plasma samples and tested for interference by the Homocysteine ELISA.

The assay demonstrated less than 10% interference in the presence of: bilirubin (0.5 g/L), haemoglobin (10 g/L), triglycerides (10 g/L), red blood cells (5.0% v/v), protein (80 g/L) and sodium-fluoride (10 g/L).

14.6 Cross-reactivity

Cross-reactivity was tested for compounds that may interfere with the Homocysteine ELISA.

The assay demonstrated 16% cross-reactivity in the presence of S-adenosyl-L-methionine (0.5 mmol/L) and less than 1% cross-reactivity in the presence of: Adenosine (5.0 mmol/L), cystathionine (0.5 mmol/L), L-cysteine (100 mmol/L), glutathione (100 mmol/L) and thiolactone (0.5 mmol/L).

15 PRODUCT SAFETY INFORMATION

Reagent D R-20/21/22 Harmful by inhalation, in contact with skin and if swallowed.
R-33 Danger of cumulative effects.
S-24 Avoid contact with skin.
S-28 After contact with skin, wash immediately with plenty of water.
S-36/37/39 Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.

Reagent S R-36/38 Irritating to eyes and skin.
S-25 Avoid contact with eyes.
S-26 In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S-37/39 Wear suitable gloves and eye/face protection.

1 VERWENDUNGSZWECK

Der Homocysteine ELISA 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.

2 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. [1, 2, 3, 4] 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-B₆-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.[2,4]

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.[1, 5] Eine Hcy-Senkungstherapie verbessert die Prognose für diese Krankheit.[5]

Es gibt darüber hinaus auch andere, weniger schwere genetische Defekte, die zu mäßig erhöhten Hcy-Werten führen. [6, 7, 8]

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 Verschlusskrankheit deutlich.[9]

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

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.[12, 13]

Medikamente wie Methotrexat, Carbamazepin, Phenytoin, Distickstoffoxid und Penicillin beeinträchtigen den Hcy-Metabolismus und können zu erhöhten Hcy-Werten führen.[14, 15]

3 TESTPRINZIP

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

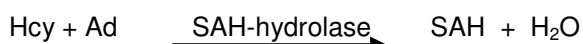
Reduktion

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



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.

4 VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Nur zur Verwendung bei der In-vitro-Diagnose.
2. Das Reagenz D enthält 0,15 % Merthiolat (< 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 Kit 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 1,6 N saure Lösung 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 Standards, 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) 93-839518 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.

5 BESTANDTEILE DES KITS**Homocysteine ELISA Kit, 96 Mulden.**

Bestandteile des Kits	Lösung	Beschreibung der Komponenten	Volumen
[REAG A] / BUF	Assay-Puffer	Phosphatpuffer, Natriumazid	54 mL
[REAG B] / ADENO DTT	Adenosine/DTT	Adenosin, Dithiothreitol, Citronensäure	3.5 mL
[REAG C] / SAH HYDROL	SAH-Hydrolase	Rekombinant S-Adenosyl-L-Homocystein-Hydrolase, Tris-Puffer, Glycerin, Methylparaben	3.5 mL
[REAG D] / ENZ INH	Enzym Inhibitor	Merthiolat, Phosphatpuffer	55 mL
[REAG E] / ADENO DEAM	Adenosine de-aminase	Phosphatpuffer, Natriumazid, BSA, Farbstoff Phenolrot	55 mL
[REAG F] / SAH Ab	a-SAH Anti-körper	Monoklonaler Maus-Anti-S-Adenosyl-L-Homocystein-Antikörper, BSA, Merthiolat	25 mL
[REAG G] / ENZ CONJ	Enzymkonjugat	Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper- Enzymkonjugat, BSA, Meerrettich-peroxidase, blauer Farbstoff	15 mL
[REAG H] / SUB TMB	Substratlösung	N-Metyl-2-Pyrrolidon, Propylenglycol	15 mL
[REAG S] / STOP SOLN	Stop Solution	Inhibitorlösung: 1,6 N saure Lösung	20 mL
BUF WASH 10x	Waschpuffer:	Phosphatpuffer, Merthiolat, Tween 20, BSA	60 mL
CAL 1 - 6	Kalibratoren	S-Adenosyl-L-Homocystein (2, 4, 8, 15, 30, 50 µmol/L) in Puffer mit Konservierungsstoff	6 x 1.5 mL
SORB MT	Mikrotiterstreifen	Beschichtet mit S-Adenosyl-L-Homocystein	12 x 8 wells

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

Alle anderen Komponenten sind gebrauchsfertig.

Homocysteine ELISA Control Kit (REF DE3329)

Bestandteile des Kits	Beschreibung der Komponenten	Volumen
[CONTROL L]	7,0 µmol/l Homocystein in verdünntem Humanserum, Phosphatpuffer und Konservierungsstoff	1.5 mL
[CONTROL M]	12,5 µmol/l Homocystein in verdünntem Humanserum, Phosphatpuffer und Konservierungsstoff	1.5 mL
[CONTROL H]	25,0 µmol/l Homocystein in verdünntem Humanserum, Phosphatpuffer und Konservierungsstoff	1.5 mL

Die Kontrollen sind gebrauchsfertig.

Homocysteine ELISA Wash Buffer

Bestandteile des Kits	Beschreibung der Komponenten	Volumen
BUF WASH 10x	Washpuffer: Phosphatpuffer, Merthiolat, Tween 20, BSA	1000 mL

BUF WASH 10x ist konzentriert und muss vor der Anwendung im Verhältnis 1 : 9 mit destilliertem oder deionisiertem Wasser verdünnt werden.

5.1 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

6 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 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.

7 PROBENENTNAHME UND -LAGERUNG

Im Homocysteine ELISA 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 Serums 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.[19, 20]

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.

8 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 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.

9 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 Standards in jedem Lauf in Doppelbestimmung mitzuführen.

9.1 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 Standard/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.
 4. 15 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.
 5. 500 µl REAG E hinzufügen.
Gut durchmischen.
 6. 5 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.

9.2 Verfahrensweise für die Mikrotiterplatten

7. 25 µl verdünnte(n) Standards / Probe / Kontrolle aus Schritt 4 in die Vertiefungen der mit den SAH-beschichteten Mikrotiterstreifen pipettieren.
8. Zu jeder Vertiefung 200 µl REAG F hinzufügen.
30 Minuten bei 18-25 °C inkubieren. Bei allen Inkubationsschritten den beiliegenden Deckel verwenden.
9. Mit verdünntem Waschpuffer (Wash Buffer + 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 G hinzufügen.
20 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.
11. Mit verdünntem Waschpuffer (Wash Buffer + 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.
12. Zu jeder Vertiefung 100 µl REAG H hinzufügen.
10 Minuten bei 18-25 °C inkubieren.
13. Zu jeder Vertiefung 100 µl REAG S hinzufügen.
14. 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).

10 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

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

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

11 QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen Labors die Verwendung einer Homocystein-Kontrolle mit bekannter Konzentration.

DEMEDIATEC bietet ein Set von Kontrollen mit niedriger, mittlerer und hoher Konzentration an (REF DE3329).

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

Kontrolle	Mittlerer Hcy-Gehalt (µmol/L)	Hcy-Bereich (µmol/L)
Low	7.0	5.6 – 8.4
Medium	12.5	10.0 – 15.0
High	25.0	20.0 – 30.0

12 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.[21, 22, 23] 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.[24] In Ländern, in denen eine Anreicherung von Nahrungsmitteln mit Folsäure üblich ist, können niedrigere Hcy-Werte beobachtet werden.[25, 26]

Proben von 382 Männern und Frauen (100 Skandinavier; 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 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 $\mu\text{mol/l}$.

13 MESSBEREICH

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

14 LEISTUNGSDATEN

14.1 Präzision des Assays

Die Präzision des 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.

Proben	Hcy-Durchschnitt $\mu\text{mol/L}$	Intra-Assay-Präzision	Präzision insgesamt
Control Low	6.1	8 %	10 %
Control Medium	10.5	7 %	9 %
Control High	20.6	8 %	10 %

14.2 Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (CV < 20 %) liegt bei 1,0 $\mu\text{mol/l}$.

14.3 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 $\mu\text{mol/l}$

Korrelationskoeffizient r2: 0,99

14.4 Methodenvergleich

Der Homocysteine EIA wurde mit der HPLC-Methode der Universität Bergen verglichen.[27]

Bei einem Vergleich von 164 Patientenproben mit einer Homocysteinkonzentration zwischen 3 und 37 $\mu\text{mol/l}$ ergab sich eine lineare Regression:

Neigung: 0.94
Achsenabschnitt: - 0.09 $\mu\text{mol/L}$
Korrelationskoeffizient r^2 : 0.94

14.5 Störsubstanzen

Plasmaproben wurde Bilirubin, Hämoglobin, Lipide, rote Blutkörperchen, Protein und Natriumfluorid zugesetzt, um die Abweichung der mit 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).

14.6 Kreuzreaktivität

Für Stoffgemische, die mit dem 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).

15 INFORMATIONEN ZUM SICHEREN UMGANG MIT DEN PRODUKTEN

Reagenz D

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.

Reagenz S

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

1 USO PREVISTO

Homocysteine ELISA è stato concepito per la determinazione quantitativa della L-omocisteina totale nel siero o nel plasma umano. Il dispositivo può facilitare la diagnosi e la terapia di pazienti affetti da sospetta iperomocistemia e omocistinuria.

2 RIASSUNTO E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'omocisteina (Hcy) è un amminoacido contenente tiolo prodotto dalla demetilazione intracellulare della metionina. L'Hcy viene liberata nel plasma dove circola prevalentemente nella sua forma ossidata legata alle proteine del plasma.[1, 2, 3, 4] Sono presenti piccole quantità di omocisteina ridotta e omocisteina-disulfide (Hcy-SS-Hcy). L'omocisteina totale rappresenta la somma di tutte le forme plasmatiche e seriche di Hcy (libere e legate alle proteine).

L'Hcy può essere metabolizzata a cisteina o a metionina. Nella via della transulfurazione dipendente dalla vitamina B6 l'Hcy viene catabolizzata in modo irreversibile a cisteina. La maggior parte di Hcy viene di nuovo metilata a metionina, principalmente ad opera dell'enzima metionin sintasi, dipendente da folati e cobalamina.

Quando queste reazioni sono carenti, si verifica un accumulo di Hcy che viene poi secreta nel sangue.[2, 4]

Elevate concentrazioni di Hcy si riscontrano nei soggetti affetti da omocistinuria, una rara patologia genetica che interessa gli enzimi coinvolti nel metabolismo dell'Hcy. I pazienti affetti da omocistinuria mostrano ritardo mentale, arteriosclerosi precoce e tromboembolia arteriosa e venosa.[1, 5] La terapia mirata alla riduzione dell'Hcy migliora la prognosi per questa patologia.[5]

Si riscontrano anche altre anomalie genetiche meno gravi che portano a livelli di Hcy moderatamente elevati.[6, 7, 8]

In alcuni studi epidemiologici è stato esaminato il rapporto tra i livelli di Hcy nel sangue e l'incidenza di patologie cardiovascolari (CVD). Secondo una meta-analisi condotta su 27 di questi studi riguardante oltre 4000 pazienti, un aumento di Hcy pari a 5 µmol/l era associato ad un odd ratio di patologie delle arterie coronariche (CAD) di 1,6 negli uomini e 1,8 nelle donne, oppure è associato ad un aumento di 0,5 mmol/l (20 mg/dl) di colesterolo.

Anche per le arteriopatie periferiche è stata dimostrata una stretta correlazione.[9] Inoltre, alcuni gruppi di pazienti anemici e/o astenici presentano un rialzo della concentrazione plasmatica o serica di Hcy.[10, 11]

Nei nefropatici cronici si riscontrano tassi più elevati di morbilità e mortalità da patologie cardiovascolari arteriosclerotiche. Elevate concentrazioni ematiche di Hcy sono riscontrate di frequente in questi malati. Sebbene tali pazienti possano presentare una carenza di alcune vitamine coinvolte nel metabolismo dell'omocisteina, la maggiore concentrazione di questa sostanza è imputabile principalmente alla minore eliminazione di Hcy dal sangue da parte dei reni.[12, 13]

Farmaci quali metotressato, carbamazepina, fenitoina, ossido nitroso e penicillamina interferiscono con il metabolismo dell'omocisteina e possono provocare elevate concentrazioni di tale sostanza.[14, 15]

3 PRINCIPIO DEL PROCEDIMENTO

L'Homocysteine EIA è un immunodosaggio enzimatico per la determinazione di omocisteina nel sangue.[16]

L'Hcy legata alle proteine viene ridotta a Hcy libera e convertita enzimaticamente in S-adenosyl-L-omocisteina (SAH) nel corso di una procedura separata precedente all'immuno-dosaggio.[17] L'enzima è specifico della forma L di omocisteina, l'unica forma presente nel sangue.

Riduzione: Le forme di Hcy legate alle proteine e al disulfide misto-Hcy presenti nel campione vengono ridotte a Hcy libera con l'impiego di ditionitrito (DTT).



Conversione enzimatica: L'Hcy presente nel campione viene convertita in S-adenosyl-L-omocisteina ad opera della SAH idrolasi e dell'adenosina in eccesso (Ad).



Il seguente immunodosaggio enzimatico in fase solida si basa sulla competizione tra la SAH presente nel campione e la SAH immobilizzata legata alle pareti della piastra di microtitolazione per i siti di legame su un anticorpo monoclonale anti-SAH. In seguito alla rimozione dell'anticorpo anti-SAH, viene aggiunto un anticorpo anti-topo secondario preparato in coniglio marcato con l'enzima perossidasi di rafano (HRP). L'attività della perossidasi viene misurata con il metodo spettrofotometrico successivamente all'aggiunta di substrato; l'assorbanza è inversamente proporzionale alla concentrazione di Hcy nel campione.

4 AVVERTENZE E PRECAUZIONI

1. Solo per uso diagnostico in-vitro.
2. Il reagente D contiene lo 0,15% di mertiolato (< 0,074% di mercurio) ed è classificato come "Dannoso". Maneggiare e smaltire adeguatamente (ved. il paragrafo "Informazioni sulla sicurezza del prodotto").
3. Alcuni reagenti contengono lo 0,01% di mertiolato come conservante. Ciascun kit contiene meno dello 0,028% di mercurio. Maneggiare e smaltire adeguatamente.
4. Il reagente F contiene anticorpi di topo, mentre il reagente G contiene anticorpi di coniglio.
5. Il reagente S contiene lo 1,6 N acido soluzione ed è classificato come "Irritante". Maneggiare e smaltire adeguatamente (ved. il paragrafo "Informazioni sulla sicurezza del prodotto").
6. I calibratori, i controlli, il reagente A e il reagente E contengono meno dello 0,10% di sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con le tubature di piombo o rame -for-mando azuri metallici altamente esplosivi. Smaltire con abbondante acqua per impedire -l'accumulo di azide nelle tubature.
7. I controlli contengono siero ricavati da campioni ematici umani. I materiali di origine umana sono stati verificati e trovati negativi all'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAG), all'antigene dell'HIV-1 (HIVAg), all'anticorpo anti-HCV, all'anticorpo anti-HIV-1/2, all'anticorpo anti-HTLV-1/2 e all'anticorpo anti-core dell'epatite B (HBc). Tuttavia il trattamento degli emoderivati deve avvenire nel rispetto delle procedure raccomandate per i materiali infetti. Consultare la pubblicazione dell'HHS n. (CDC) 93-839518 o le linee guida locali/nazionali in materia di procedure per la sicurezza di laboratorio.
8. Non utilizzare insieme reagenti con numeri di lotto differenti.
9. Non usare il kit dopo la data di scadenza stampata sull'esterno della confezione.

5 COMPONENTI DEL KIT

Homocysteine ELISA, 96 pozzetti.

Componenti del kit	Soluzione	Descrizione dei componenti	Volume
[REAG A] / BUF	Tampone dosaggio	Tampone fosfato, sodio azide	54 mL
[REAG B] / ADENO DTT	Adenosina/DTT	Adenosina / ditiotreitolo, acido citrico	3.5 mL
[REAG C] / SAH HYDROL	SAH-idrolasi	Idrolasi S-adenosil-L-omocisteina ricombinante, trisbuffer, glicerolo, metilparabene	3.5 mL
[REAG D] / ENZ INH	Inibitore enzimatico	Mertiolato, tampone fosfato	55 mL
[REAG E] / ADENO DEAM	Adenosina deamasi	tampone fosfato, sodio azide, BSA, mezzo di contrasto fenolsolfonftaleina	55 mL
[REAG F] / SAH Ab	Anticorpo anti-SAH	Anticorpo monoclonale di topo anti-S-adenosil-L-omocisteina, BSA, mertiolato	25 mL
[REAG G] / ENZ CONJ	Coniugato enzima	Coniugato enzima anticorpo anti-topo preparato in coniglio, BSA, perossidasi di rafano, mezzo di contrasto blu	15 mL
[REAG H] / SUB TMB	Soluzione substrato	N-metil-2-pirrolidone propilenglicole	15 mL
[REAG S] / STOP SOLN	Stop Solution	1,6 N acido soluzione	20 mL
BUF WASH 10x	Tampone di lavaggio	Tampone fosfato, mertiolato, Tween 20, BSA	60 mL
CAL 1 - 6	Calibratori	S-adenosil-L-omocisteina (2, 4, 8, 15, 30, 50 µmol/l) in tampone con conservante	6 x 1.5 mL
SORB MT	Strisce di microtitolazione	Rivestite con S-adenosil-L-omocisteina	12 x 8 wells

BUF WASH 10x è concentrato e deve essere diluito (1+9) con acqua distillata prima dell'uso. Tutti gli altri componenti sono pronti per l'uso.

Homocysteine ELISA Control kit (DE3329) (Kit dei controlli)

Componenti del kit	Descrizione dei componenti	Volume
[CONTROL L]	7,0 µmol/l omocisteina in campioni di siero diluito di origine umana, tampone fosfato e conservante	1.5 mL
[CONTROL M]	12,5 µmol/l omocisteina in campioni di siero diluito di origine umana, tampone fosfato e conservante	1.5 mL
[CONTROL H]	25,0 µmol/l omocisteina in campioni di siero diluito di origine umana, tampone fosfato e conservante	1.5 mL

Tutti i controlli sono pronti per l'uso.

Homocysteine ELISA Wash Buffer (Tampone di lavaggio)

Componenti del kit	Descrizione dei componenti	Volume
BUF WASH 10x	Tampone fosfato, mertiolato, Tween 20, BSA	1000 mL

BUF WASH 10x è concentrato e deve essere diluito (1+9) con acqua distillata prima dell'uso.

5.1 Materiali richiesti ma non forniti nel kit:

- Controlli per omocisteina (per ulteriori informazioni ved. sezione "Controllo di qualità")
- Cannule in plastica o vetro per il pre-trattamento dei campioni
- Pipette / multipipette da 25 µl, 100 µl, 200 µl and 500 µl o multipipetta a 8 canali da 100 µl e 200 µl
- Contenitore volumetrico da 50 ml e 600 ml
- Incubatore, 37 °C
- Soluzione di lavaggio e soluzione de lettura (450 nm) per piastre di microtitolazione

6 PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI COMPONENTI DEL KIT

1. I componenti devono essere conservati in ambiente refrigerato (2 - 8 °C). Conservare tutti i flaconi in posizione verticale, ermeticamente tappati. Se conservati e maneggiati secondo le istruzioni, i controlli sono stabili fino alla data di scadenza. Una volta aperti, i componenti del kit Homocysteine EIA sono stabili per 12 settimane se conservati a 2 - 8 °C.
2. La soluzione di pretrattamento dei campioni deve essere formata unendo i reagenti A, B e C (ved. sezione "Procedura"). La soluzione è stabile per 1 ora e deve essere preparata al momento.
3. Il tampone di lavaggio è concentrato e deve essere diluito (1+9) con acqua distillata prima dell'uso. Una volta preparato, il tampone di lavaggio è stabile per 4 settimane se conservato a temperatura ambiente (18-25 °C).
4. I reagenti D e H sono conservati in flaconi scuri per evitarne l'esposizione alla luce.
5. È importante che le strisce di microtitolazione vengano conservate in ambiente asciutto, ad es. nella confezione sigillata unitamente a capsule essiccanti, e refrigerato. È necessaria una fasi di equilibratura di almeno due ore per raggiungere la temperatura ambiente (18 - 25 °C). Lasciare le strisce nella confezione durante la fase di equilibratura.
6. Durante la procedura posizionare nel frame solo le strisce di microtitolazione necessarie. Le strisce non utilizzate devono essere conservate nella confezione sigillata unitamente a capsule essiccanti.
7. Non esporre il kit a temperature superiori a 37 °C che potrebbero provocare la denaturazione degli enzimi.

7 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Con il dosaggio Homocysteine EIA è possibile utilizzare campioni di plasma o siero EDTA. Poiché dopo il prelievo la sintesi di Hcy nei globuli rossi continua, è molto importante preparare i campioni come descritto di seguito:

- Lasciare coagulare i campioni di siero per non più di 30 minuti prima della centrifuga e della separazione dal siero. I campioni di siero devono essere conservati nel ghiaccio prima della separazione.
- I campioni di plasma EDTA devono essere centrifugati o messi nel ghiaccio immediatamente dopo il prelievo. I campioni di plasma EDTA possono essere conservati nel ghiaccio fino a 6 ore prima della separazione mediante centrifuga.

L'assunzione di cibo può influire sui livelli di omocisteina. Pasti ricchi di proteine hanno elevati valori di omocisteina e pertanto ne deve essere evitata l'assunzione la sera prima del prelievo.[19, 20]

A causa dei fattori di influenza sopra menzionati, è di fondamentale importanza attenersi alle procedure di prelievo standard. Prima dell'uso miscelare accuratamente i campioni scongelati.

I campioni di plasma o siero possono essere conservati per 12 settimane a 2 - 8 °C, per un massimo di 3 settimane a temperatura ambiente (18 - 25 °C) e si sono dimostrati stabili per almeno 8 mesi se congelati ad almeno 20 °C.

8 LIMITAZIONI

- Se si utilizza una stazione di pipettamento automatica, può essere necessario eseguire un lavaggio accurato del sistema di tubi in seguito all'aggiunta del colorante blu G – preferibilmente con acido diluito, quindi con acqua. Eventuali residui di soluzione nei tubi interferiscono con la successiva fase del test; ad es. aggiunta di soluzione H.
- La procedura di lavaggio è pertanto fondamentale per ottenere risultati precisi. Qualora sia necessario eseguire un lavaggio manuale, eseguire 4 lavaggi con 350 µl invece di 3 lavaggi con 400 µl. Dopo il lavaggio svuotare i pozzetti su asciugamani di carta.
- Non esporre il kit a temperature superiori a 37 °C che potrebbero provocare la denaturazione degli enzimi.
- Campioni provenienti da pazienti sottoposti a terapia farmacologica con S-adenosil-metionina possono presentare livelli di omocisteina falsamente elevati.
- Campioni provenienti da pazienti trattati con preparazioni di anticorpi monoclonali di topo a scopo diagnostico o terapeutico possono contenere anticorpo umano antimurino (HAMA). L'HAMA, presente nei campioni di siero o plasma, può interferire in immunodosaggi che utilizzano anticorpi monoclonali di topo. Tali campioni non devono essere testati con il dosaggio Homocysteine EIA.
- Campioni provenienti da pazienti trattati con metotressato, carbamazepina, fenitoina, ossido di nitro, anti-convulsivi o 6-azauridina, possono presentare elevati livelli di omocisteina a causa dell'interferenza metabolica con il metabolismo dell'omocisteina.

9 PROCEDURA

Prima dell'uso assicurarsi che tutte le soluzioni e le strisce di microtitolazione siano stati equilibrati a temperatura ambiente. Si consiglia di lasciare il kit a temperatura ambiente per l'intera notte. Si consiglia di eseguire il ciclo dei calibratori in doppio e di eseguire una nuova curva di calibrazione per ciascun ciclo per evitare variazioni da un ciclo all'altro utilizzando piastre di microtitolazione rivestite.

9.1 Procedura di pretrattamento dei campioni

1. La soluzione di pretrattamento dei campioni deve essere preparata non più di 1 ora prima dell'inizio del test. Volume necessario per 10 campioni (volume morto non calcolato):

4,5 ml REAG A
0,25 ml REAG B
0,25 ml REAG C Miscelare.

2. Diluire i calibratori e i campioni/controlli in provette di plastica o vetro come indicato di seguito:

25 µl di calibratore/campione/controllo
+ 500 µl la soluzione di pretrattamento dei campioni Miscelare accuratamente.
Tenere in incubazione per 30 minuti a 37 °C (Durante l'incubazione chiudere le provette con il tappo o coprire con parafilm).

Nota: Passare alla fase 3 prima che i campioni si siano raffreddati.

3. Aggiungere 500 µl REAG D
Miscelare accuratamente. Tenere in incubazione per 15 minuti a 18-25 °C.

4. Aggiungere 500 µl REAG E
Miscelare accuratamente. Tenere in incubazione per 5 minuti a 18-25 °C.

9.2 Procedura per la piastra di microtitolazione

5. Inserire il calibratore / campione / controllo diluito in pipetta da 25 µl utilizzato nella fase 4 nei pozzetti delle strisce per microtitolazione rivestite di SAH.
6. Aggiungere 200 µl REAG F in ogni pozzetto.
Tenere in incubazione per 30 minuti a 18-25 °C.
Durante tutti i periodi di incubazione utilizzare il coperchio fornito in dotazione.
7. Lavare con tampone di lavaggio diluito (Wash Buffer + acqua distillata).
Utilizzare 3 x 400 µl. Qualora sia necessario eseguire un lavaggio manuale, eseguire 4 lavaggi con 350 µl invece di 3 lavaggi con 400 µl. Dopo il lavaggio svuotare i pozzetti su asciugamani di carta.
8. Aggiungere 100 µl REAG G in ogni pozzetto.
9. Tenere in incubazione per 20 minuti a 18-25 °C.
10. Lavare con tampone di lavaggio diluito (Wash Buffer + acqua distillata).
Utilizzare 3 x 400 µl. Qualora sia necessario eseguire un lavaggio manuale, eseguire 4 lavaggi con 350 µl invece di 3 lavaggi con 400 µl. Dopo il lavaggio svuotare i pozzetti su asciugamani di carta.
11. Aggiungere 100 µl REAG H in ogni pozzetto.
12. Tenere in incubazione per 10 minuti a 18-25 °C
13. Aggiungere 100 µl REAG S in ogni pozzetto.
14. Agitare ed eseguire la lettura a 450 nm entro 15 minuti (per miscelare accuratamente è preferibile utilizzare uno scuotitore automatico).

10 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'interpretazione dei risultati deve avvenire alla luce dei risultati di tutti gli altri test e delle condizioni cliniche del paziente.

Per la preparazione della curva di calibrazione ed il calcolo di campioni sconosciuti si consiglia di utilizzare una curva logistica a quattro parametri.

11 CONTROLLO DI QUALITÀ

Ciascun laboratorio dovrebbe utilizzare un controllo per omocisteina con valore conosciuto.

DEMEDIATEC fornisce una serie di controlli bassi, medi e alti (REF DE3329). I controlli contengono L-omocisteina in siero umano trattato nelle seguenti concentrazioni:

Controllo	Valore medio Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	Intervallo Hcy ($\mu\text{mol/L}$)
Low	7.0	5.6 - 8.4
Medium	12.5	10.0 – 15.0
High	25.0	20.0 – 30.0

12 INTERVALLO DI VALORI DI RIFERIMENTO

Ogni laboratorio deve determinare un intervallo di valori di riferimento corrispondente alle caratteristiche della popolazione esaminata. Finché il laboratorio non ha analizzato un numero di campioni sufficiente a determinare tale intervallo di riferimento, è possibile utilizzare i dati di seguito indicati.

Nei soggetti sani, la concentrazione plasmatica o serica di Hcy varia in base a età, sesso, area geografica o fattori genetici. Per i soggetti adulti, uomini e donne, la letteratura scientifica riporta valori di riferimento fra 5 e 15 $\mu\text{mol/l}$. Vengono riportati valori più alti per gli uomini rispetto alle donne, mentre le donne che hanno superato la menopausa hanno valori di omocisteina più alti rispetto a quelle in età pre-menopausa.[21, 22, 23] Di norma, i valori di Hcy aumentano con l'età, indicando per i soggetti anziani (> 60 anni) un intervallo di valori di riferimento di 5 - 20 $\mu\text{mol/l}$.[24]

Nei paesi che attuano programmi di rafforzamento di acido folico si osservano livelli di Hcy più bassi.[25, 26]

Utilizzando il dosaggio Homocysteine EIA sono stati analizzati campioni prelevati da 382 uomini e donne (100 scandinavi: 54 uomini di età compresa fra 30 e 60 anni, 46 donne di età compresa fra 29 e 70; 185 ispanici: prevalentemente uomini di età compresa fra 20 e 65; 97 americani: 54 uomini di età compresa fra 16 e 74, 43 donne di età compresa fra 15 - 79), apparentemente sani, in assenza di informazioni su eventuali terapie mediche in corso, stati patologici o condizioni di rischio sconosciute per elevati livelli di omocisteina. Il valore medio della concentrazione di omocisteina tra i soggetti scandinavi era di 8,4 $\mu\text{mol/l}$, tra gli ispanici di 8,9 $\mu\text{mol/l}$ e tra gli americani di 9,3 $\mu\text{mol/l}$. L'intervallo dei valori di riferimento per l'omocisteina è stato determinato con il 95% di limite di sicurezza come 5 - 15 $\mu\text{mol/l}$ per la popolazione scandinava, 3,6 – 15,0 $\mu\text{mol/l}$ per la popolazione americana e 2,9 – 16,0 $\mu\text{mol/l}$ per la popolazione ispanica.

13 INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo del calibratore è compreso fra 2 e 50 $\mu\text{mol/l}$.

14 DATI RELATIVI ALLE PRESTAZIONI

14.1 Precisione del test

La precisione del dosaggio Homocysteine EIA è stata valutata secondo il protocollo EP5-T2 del Comitato nazionale per gli standard clinici di laboratorio (National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS). La precisione è stata testata eseguendo 3 livelli di controlli per 20 giorni con 4 ripetizioni per ciclo di ciascun livello. I dati relativi alla precisione sono riassunti nella Tabella.

Campioni	Hcy media $\mu\text{mol/L}$	Precisione durante il dosaggio	Precisione totale
Control Low	6.1	8 %	10 %
Control Medium	10.5	7 %	9 %
Control High	20.6	8 %	10 %

14.2 Limite di quantificazione

Il limite di quantificazione (CV < 20%) è di 1,0 µmol/l.

14.3 Linearità di campioni di plasma diluiti

Se la concentrazione di omocisteina di un campione è superiore all'intervallo della curva di calibrazione, il campione deve essere diluito con Reagente A e nuovamente analizzato.

La linearità è stata valutata diluendo quattro campioni pazienti alti con diverse quantità di Reagente A come diluente.

L'analisi di regressione lineare ha fornito i seguenti risultati:

Pendenza: 0,98

Intersezione: -0,4 µmol/l

Coefficiente di correlazione r^2 : 0,99

14.4 Confronto dei metodi

L' Homocysteine EIA è stato confrontato con il metodo HPLC della University of Bergen.[27]

Il confronto di 164 campioni paziente variabili fra 3 e 37 µmol/l di omocisteina ha fornito la regressione lineare:

Pendenza: 0,94

Intersezione: -0,09 µmol/l

Coefficiente di correlazione r^2 : 0,94

14.5 Interferenze con altre sostanze

Sostanze quali bilirubina, emoglobina, lipidi, globuli rossi, proteine e fluoruro di sodio sono state aggiunte ai campioni di plasma e ne è stata testata l'interferenza con l' Homocysteine EIA.

Il test ha dimostrato un'interferenza inferiore al 10% in presenza di:

bilirubina (0,5 g/l), emoglobina (10 g/l), trigliceridi (10 g/l), globuli rossi (5,0% v/v), proteine (80 g/l) e fluoruro di sodio (10 g/l).

14.6 Reattività incrociata

La reattività incrociata è stata valutata per i composti che possono interferire con il dosaggio Homocysteine EIA. Il dosaggio ha dimostrato una reattività incrociata del 16% in presenza di S-adenosil-L-metionina (0,5 mmol/l) e una reattività incrociata inferiore all'1% in presenza di: adenosina (5,0 mmol/l), cistationina (0,5 mmol/l), L-cisteina (100 mmol/l), glutatione (100 mmol/l) e tiolattone (0,5 mmol/l).

15 INFORMAZIONI SULLA SICUREZZA DEL PRODOTTO

Reagent D

R-20/21/22 Dannoso se inalato, a contatto con la pelle e ingerito.

R-33 Pericolo di effetti cumulativi.

S-24 Evitare il contatto con la pelle.

S-28 In seguito al contatto con la pelle, lavare immediatamente con abbondante acqua.

S-36/39 Indossare indumenti di protezione e guanti adeguati e utilizzare un'adeguata protezione per gli occhi/il viso.

Reagent S

R-36/38 Irritante per gli occhi e la pelle.

S-25 Evitare il contatto con gli occhi.

S-26 In caso di contatto con gli occhi, sciacquare immediatamente con abbondante acqua e richiedere l'intervento di un medico.







S-37/39 Indossare guanti di protezione adeguati e utilizzare un'adeguata protezione per gli occhi/il viso

16 REFERENCES / LITERATURE

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;274:1049-1 057.
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* 1 990;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-1 272S.
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* 1 995;1 64 (Suppl. 1 5):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;44:31 1-316.
17. Sundrehagen E. Axis Biochemicals ASA. Enzymatic assay for homocysteine and a kit therefor. EP 623174/US5631 127.
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;207:1 19-1 28.

20. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum H. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiols 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* 1 999;340: 1449-1454.
26. Lawrence JM, Pettitt DB, Watkins M, Umekubo MA. Trends in serum folate after food fortification. *Lancet* 1 999;354:91 5-916.
27. Fiskerstrand T, Refsum H, Kvalheim G, Ueland PM, Homocysteine and other thiols in plasma and urine: Automated determination and sample stability. *Clin Chem* 1 993;39:263-271.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità