

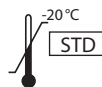
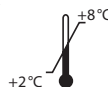
IDK[®] Homocystein DBS LC-MS/MS

***Zur Bestimmung von Homocystein in Trockenblutspots
For the determination of homocysteine in dried blood spots***

Gültig ab 2017-02-17



KM7000DBS



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. TESTPRINZIP	2
4. INHALT DER TESTPACKUNG	3
5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	4
7. PROBENVORBEREITUNG	5
8. TESTDURCHFÜHRUNG	5
9. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN	6
HPLC-Methode	6
10. MS/MS-METHODE	7
MRM-Übergänge (m/z) für Waters Micromass Quattro Ultima	7
MRM-Übergänge (m/z) für Waters XEVO TQ MS	7
11. AUSWERTUNG	7
12. MUSTERCHROMATOGRAMME	8
13. QUALITÄTSKONTROLLE	8
Referenzbereich (Vollblut)	9
14. TESTCHARAKTERISTIKA	9
Präzision und Reproduzierbarkeit	9
Nachweisgrenze	9
15. VORSICHTSMASSNAHMEN	10
16. TECHNISCHE MERKMALE	10
17. ENTSORGUNG	10
18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	10
19. LITERATUR	11

1. VERWENDUNGSZWECK

Die hier beschriebene *dried blood spot* (DBS) LC-MS/MS-Applikation ist für die quantitative Bestimmung von Homocystein aus Trockenblutspots geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Homocystein kommt im Blut in freier Form und zu ca. 70 % an Albumin gebunden vor. Methionin wird nach einigen Stoffwechselschritten zunächst in Homocystein umgewandelt, dies wird mit Hilfe der Cystathion-Beta-Synthase (Cofaktor Vitamin B₆) weiter umgewandelt zu Cystin und danach abgebaut. Bei einem Mangel des Enzyms steigen die Konzentrationen an Methionin und Homocystein an, die von Cystin nimmt ab. Daraus resultiert die Homocysteinurie, die unbehandelt zu psychomotorischen Behinderungen führt.

Neuere Ergebnisse zeigen, dass Homocystein ein wichtiger Risikofaktor für koronare Arterienerkrankungen ist. Hohe Werte findet man gehäuft bei Menschen mit einem genetischen Defekt im Eiweißstoffwechsel, das Homocystein wird nicht abgebaut. Untersuchungen zufolge ist dies die Ursache für 40 % aller Herzinfarktfälle in den USA. Außerdem steigt das Risiko eines Schlaganfalles proportional mit der Konzentration von Homocystein im Blut.

Mit den Vitaminen B₆, B₁₂ und Folsäure kann der erhöhte Plasma-Homocysteinspiegel wirksam und ohne Nebenwirkungen gesenkt werden.

3. TESTPRINZIP

Das Homocystein aus den Trockenblutspots wird im ersten Schritt unter Zugabe von Reduktionslösung inklusive internem Standard reduziert und extrahiert, im zweiten Schritt über Filterzentrifugationsplatten aufgereinigt, verdünnt und dann injiziert.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
KM7000LA	MOPHA A	Laufmittel A	1000 ml
KM7000LB	MOPHA B	Laufmittel B	1000 ml
KM7000ST	STD	Standard (lyophil. 200 µl); Konzentration der Spezifikation entnehmen	4 vials
KM7000KO	CTRL1 CTRL2	Trockenblutspots auf Filterpapier; Konzentration der Spezifikation entnehmen	2 x 8
KM7000RL	REDSOL	Reduktionslösung (lyoph. 600 µl)	4 vials
KM7000VL	DIL	Verdünnungslösung	22 ml
KM7000AC	ACTSOL	Aktivierungsreagenz	2,5 ml
KM7000IS	INT STD	Interner Standard	4,5 ml
KM7000SO	SOL	Standardverdünnungslösung	5 ml

Die HPLC-Trennsäule (KM7000RP), die Elutionsplatten (KM7000PL) und die 96-Well-Plates (KM7000MSP) können separat bei Immundiagnostik AG bestellt werden. Neben den kompletten Kits können auch alle Komponenten einzeln bestellt werden.

Zur Vorbereitung der *IDK*® Homocystein LC-MS/MS-Applikation ist das Tuning notwendig. Das Tuning ist für die Findung der optimalen LC-MS/MS-Einstellungen erforderlich. Die Reinsubstanzen hierfür (KM7000TU [5 ml], KM7000TS [2 ml]) können ebenfalls bei Immundiagnostik AG bezogen werden.

5. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10–1000 µl
- Multipipette
- Zentrifuge, 3000 g für Elutionsplatten und 96-Well-Plates
- Vortex-Mixer
- HPLC-Säule, Atlantis™ HILIC Silica 2.1 x 50 mm, 3 µm (KM7000RP)
- Vorsäule, Atlantis™ HILIC Silica 3 µm, 2.1 x 10 mm Guard Column (KM7000VS)
- Vorsäulenhalter (KM7000VH)
- LC-MS/MS-Anlage
- Elutionsplatte KM7000PL, Multiscreen Filter Plates (Merck #MSGVN2210)
- 96-well-Platte KM7000MSP (Greiner #655201)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln $> 0,2 \mu\text{m}$) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu\text{S/cm}$ bei 25°C ($\geq 18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$).

6. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz des Assays darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**.
- Die **Reduktionslösung** (REDSOL) wird mit **600 μl Reinstwasser** rekonstituiert.
- **Die Laufmittel** (MOPHA A, MOPHA B) und **Verdünnungslösung** (DIL) müssen vor Gebrauch mit **0,1 % Aktivierungsreagenz** (ACTSOL) versetzt werden, z. B.

500 ml MOPHA + 500 μl ACTSOL

22 ml DIL + 22 μl ACTSOL

Mit ACTSOL versetzte Lösungen können 4 Wochen bei $2-8^\circ\text{C}$ gelagert werden.

ACHTUNG: Das **Aktivierungsreagenz** muss unter dem **Abzug** zugesetzt werden. Alle zu verwendenden Gefäße müssen absolut sauber und detergentienfrei sein und vorzugsweise aus LC-MS/MS-geeignetem Glas.

- **Kontrollen** (CTRL) werden fertig auf Filterpapier als Trockenblutspots mitgeliefert. Die Konzentration ist der jeweiligen Spezifikation zu entnehmen. Kontrollfilter können bei **$2-8^\circ\text{C}$** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum gelagert werden.
- **Vorbereitung der Standards:** Aus dem mitgelieferten Standard muss eine **Standardverdünnungsreihe** erstellt werden. Die Rekonstitutionsvorgaben sowie eine Empfehlung für die Verdünnung sind dem **Spezifikationsdatenblatt** zu entnehmen.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **$2-8^\circ\text{C}$** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

7. PROBENVORBEREITUNG

- Als Probe eignet sich auf DrySpot-ID-Filterkarten (Katalognummer DZ9020ID) getrocknetes Kapillarblut. Es darf ausschließlich DrySpot-ID als Trockenblut-träger verwendet werden. Die benetzten Karten sind für 3 Monate bei 2–8 °C stabil.
- Für jede Probe wird ein Trockenblutspot aus der Filterkarte ausgestanzt (bei Doppelwerten zwei) und in die jeweilige Vertiefung der Platte gegeben. Die Größe der Trockenblutspots beträgt 1/8" oder 3,2 mm bzw. entspricht 3 µl Vollblut.
- Nicht verwendete Wells der Elutionsplatte können abgeklebt werden.

8. TESTDURCHFÜHRUNG

Wir empfehlen, die Bestimmungen in Doppelwerten durchzuführen.

1.	Elutionsplatte auf 96-Well-Platte stellen.
2.	Trockenblutspots der Proben und Kontrollen (CTRL) in die jeweiligen Vertiefungen geben, sowie 30 µl frisch verdünnten Standard (STD) .
3.	Internen Standard (INT STD) und Reduktionslösung (REDSOL) im Verhältnis 2:1 mischen, z. B. 1000 µl INT STD + 500 µl REDSOL.
4.	60 µl der Mischung in jedes Well dazugeben.
5.	30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln schütteln.
6.	2 min bei 3000 g zentrifugieren.
7.	Elutionsplatte entfernen und, falls aufgebraucht, verwerfen.
8.	200 µl Verdünnungslösung (DIL) zum Eluat hinzugeben.
9.	96-well-Platte mit Aluminiumfolie bedecken und diese fest andrücken , um Verdunstung zu verhindern.
10.	96-Well-Platte in LC-MS/MS-System stellen.
11.	3 µl injizieren .

9. CHROMATOGRAPHISCHE BEDINGUNGEN

HPLC-Methode

Säule: Atlantis™ HILIC Silica 2.1 x 50 mm, 3 µm (Waters 186002011)

Fluss: 300–350 µl/min

Säulentemperatur: 30 °C

Auftragsvolumen: 3 µl

Gradient:

Zeit (min)	% A	% B	Flussrate [µl/min]
0.0	95	5	300
0.5	95	5	300
4.5	70	30	350
5.0	60	40	350
7.0	95	5	350

Wir empfehlen die Verwendung einer Vorsäule/Vorfilter, um die Säulenhaltbarkeit zu verlängern. Die Vorsäulenkartusche (KM7000VS) und Vorsäulenhalter (KM7000VH) können separat bei Immundiagnostik bestellt werden.

Zusätzlich empfehlen wir das Verwenden eines Schaltventils, um das Massenspektrometer zu schonen. Die ersten 2,5 Minuten eines jeden Laufs können dann in den Waste laufen.

Nach der Analyse sollte die Trennsäule mit Acetonitril bei 300 µl/min für ca. 30 Minuten gespült werden.

10. MS/MS-METHODE

Die Parameter für die MS/MS-Methode sind in der folgenden Tabelle für zwei Geräte beispielhaft aufgeführt.

Spalte A enthält die Parameter für ein **Waters Micromass Quattro Ultima Tandem-Massenspektrometer**.

Spalte B enthält die Parameter für ein **Waters XEVO TQ MS**.

Parameter	A	B
Modus:	MRM	MRM
Polarität:	ESI+	ESI+
Kapillarspannung (kV):	3,5	3,0
Konusspannung (V):	20	20
Extraktor (V):	3	3
RF Linse (V):	3	–
Quellentemperatur (°C):	100	150
Desolvation-Temperatur (°C):	250	600
Gasfluss am Konus (L/Hr):	120	20
Desolvation-Gasfluss (L/Hr):	700	100

MRM-Übergänge (m/z) für Waters Micromass Quattro Ultima

Homocystein	136 > 90	Kollisionsenergie: 11
DL-d ₄ -Homocystin	140 > 94	Kollisionsenergie: 11

MRM-Übergänge (m/z) für Waters XEVO TQ MS

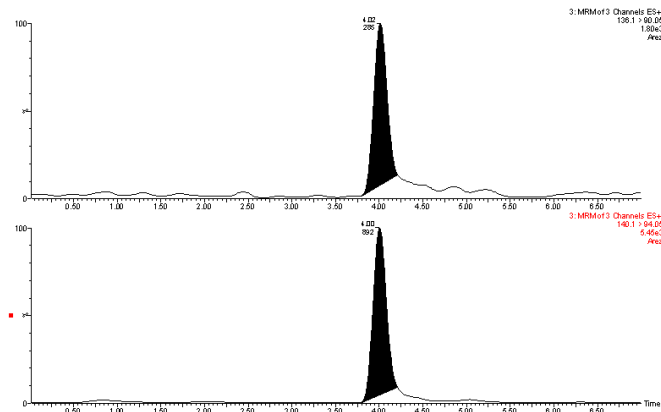
Homocystein	136 > 90	Kollisionsenergie: 12
DL-d ₄ -Homocystin	140 > 94	Kollisionsenergie: 10

11. AUSWERTUNG

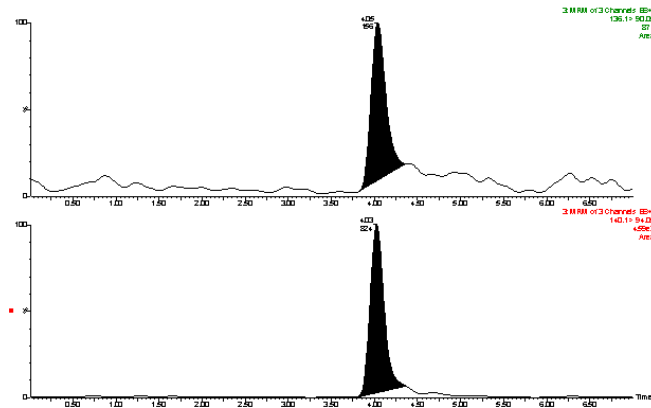
Als Modell zur Auswertung kann die lineare Regression unter Berücksichtigung des internen Standards verwendet werden. Zwischen den Standardkonzentrationen wird eine Gerade gelegt. Anhand dieser können dann die Proben berechnet werden.

12. MUSTERCHROMATOGRAMME

Probe



Kalibrator



13. QUALITÄTSKONTROLLE

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Referenzbereich (Vollblut)

< 8 µmol/l	a) kein erhöhtes Homocystein-abhängiges Risiko
8–10 µmol/l	b) grenzwertiger Befund. Schädliche Auswirkungen, beispielsweise über Einfluss auf die Gerinnung, bereits möglich. Erhöhtes Risiko daher nicht auszuschließen, Behandlung empfohlen.
10–15 µmol/l	c) erhöhter Homocysteinspiegel mit gefäßaggressiven Wirkungen: deutliche Risikosteigerung, z. B. für Gefäßeingengungen an der Karotis, durch Studien belegt. Behandlung erforderlich.
> 15 µmol/l	d) deutlich erhöhte Homocysteinkonzentration mit deutlich gesteigertem Arterioskleroserisiko in den Gefäßgebieten Herz, Gehirn, periphere Arterien, erhöhtes Risiko für Thromboembolien; Behandlung unbedingt erforderlich. Verdopplung des Risikos für Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson.

Eine laborinterne Messung von neun augenscheinlich gesunden Personen ergab Messwerte im Bereich von 2,8–7,9 µmol/l.

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Referenzwertbereich zu etablieren.

14. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra-Assay-VK

4,8 % (19,8 µmol/l) [n = 10]

5,1 % (25,5 µmol/l) [n = 10]

Inter-Assay-VK

9,6 % (8,99 µmol/l) [n = 5]

Nachweisgrenze

Nachweisgrenze Homocystein: 0,42 µmol/l

Es muss beachtet werden, dass die Bestimmung der Nachweisgrenze nicht ausschließlich applikationsabhängig, sondern auch geräteabhängig ist.

15. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Das Aktivierungsreagenz besteht aus Säure und muss mit Vorsicht behandelt werden. Sie verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

16. TECHNISCHE MERKMALE

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

17. ENTSORGUNG

- Laufmittel (MOPHA A, MOPHA B), Standardverdünnungslösung (SOL), Verdünnungslösung (DIL) und Aktivierungsreagenz (ACTSOL) müssen als halogenfreier Lösungsmittelabfall entsorgt werden.

18. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- *IDK*® ist eine Marke der Immundiagnostik AG.

- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

19. LITERATUR

<http://www.deutsche-gefaessliga.de/homocystein.html>

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Zu verwenden mit



Hersteller



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Chargenbezeichnung



Verwendbar bis



Achtung

IDK[®] Homocystein DBS

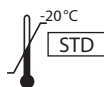
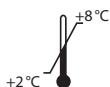
LC-MS/MS

For the determination of homocysteine in dried blood spots

Valid from 2017-02-17



KM7000DBS



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1. INTENDED USE	15
2. INTRODUCTION	15
3. PRINCIPLE OF THE TEST	15
4. MATERIAL SUPPLIED	16
5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	16
6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	17
7. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES	18
8. TEST PROCEDURE	18
9. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS	19
<i>HPLC method</i>	19
10. MS/MS METHOD	20
<i>MRM transitions (m/z) for Waters Micromass Quattro Ultima</i>	20
<i>MRM transitions (m/z) for Waters XEVO TQ MS</i>	20
11. CALCULATION	20
12. CHROMATOGRAM EXAMPLES	21
13. QUALITY CONTROL	21
<i>Reference range (whole blood)</i>	22
14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	22
<i>Precision and reproducibility</i>	22
<i>Detection limit</i>	22
15. PRECAUTIONS	22
16. TECHNICAL HINTS	23
17. DISPOSAL	23
18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	23
19. REFERENCES	24

1. INTENDED USE

This *dried blood spot* (DBS) LC-MS/MS application is intended for the quantitative determination of homocysteine in dried blood spots. For *in vitro* diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Homocysteine occurs in blood as well as free molecule as bound to albumin. Following a distinct metabolic pathway, methionin is changed to homocystein, which then is further metabolized by cystathionine beta synthase (cofactor vitamin B6) resulting in cystein which is then degraded. A deficiency of the enzyme results in rising concentrations of methionin and homocysteine and a decreasing concentration of cystine. This leads to homocystinuria which causes psychomotor disabilities if untreated.

It has been shown that homocysteine is an important risk factor for coronary heart disease. High values can be found in samples of patients with a genetic defect which results in a failure in homocysteine metabolism. It has been published that this is the cause of 40% of all heart attacks in the USA. Furthermore, the risk of stroke increases proportionally to the concentration of homocystein in blood.

Vitamin B6, B12 and folic acid can be used for reducing high plasma levels of homocystein effectively and without known side-effects.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

In the first step, the homocystein in the dried blood spots is reduced and extracted. Therefore reduction solution including an internal standard is added. In the second step, the sample is purified by filter centrifugation plates, diluted and injected.

4. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
KM7000LA	MOPHA A	Mobile phase A	1000 ml
KM7000LB	MOPHA B	Mobile phase B	1000 ml
KM7000ST	STD	Standard (lyoph. 200 µl); see specification for concentration	4 vials
KM7000KO	CTRL1 CTRL2	Dried blood spots on dried blood spot carrier; see specification for concentrations	2 x 8
KM7000RL	REDSOL	Reduction solution (lyoph. 600 µl)	4 vials
KM7000VL	DIL	Dilution reagent	22 ml
KM7000AC	ACTSOL	Activation solution	2.5 ml
KM7000IS	INT STD	Internal standard	4.5 ml
KM7000SO	SOL	Standard dilution solution	5 ml

The HPLC separation column (KM7000RP), the elution plates (KM7000PL) and the 96-well plates (KM7000MSP) can be ordered separately from Immundiagnostik AG. The complete kit well as all individual components can be ordered separately. Please ask for our single component price list.

For the preparation of the *IDK*® homocysteine LC-MS/MS application, tuning is necessary for finding the optimal LC-MS/MS settings. The pure substances for the tuning (KM7000TU [5 ml], KM7000TS [2 ml]) can also be ordered at Immundiagnostik AG.

5. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Calibrated precision pipettors and 10–1000 µl tips
- Multi-channel pipet
- Centrifuge, 3000 g, for elution plates and 96-well plates
- Vortex
- HPLC column, Atlantis™ HILIC Silica 2.1 x 50 mm, 3 µm (KM7000RP)
- Pre-column, Atlantis™ HILIC Silica 3 µm, 2.1 x 10 mm Guard Column (KM-7000VS)
- Guard column holder (KM7000VH)
- LC-MS/MS machine
- Elution plate KM7000PL, multiscreen filter plates (Merck #MSGVN2210)
- 96-well plate KM7000MSP (Greiner #655201)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

6. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.**
- Reconstitute the **reduction solution** (REDSOL) with **600 µl ultra pure water**
- **The mobile phases** (MOPHA A, MOPHA B) and **dilution reagent** (DIL) must be prepared before use by adding **0.1 % activation solution** (ACTSOL), e. g.

500 ml MOPHA + 500 µl ACTSOL

22 ml DIL + 22 µl ACTSOL

Reagents containing ACTSOL can be stored for 4 weeks at 2–8 °C.

ATTENTION: The **activation solution** must be added under a **fume hood**. All vessels used must be absolutely clean, free of detergents and preferably made of LC-MS/MS-suitable glass.

- **Controls** (CTRL) are delivered in the kit as dried blood spots on filter paper. The concentration is given on the respective specification. Controls can be stored at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label.
- **Preparation of the standard:** The supplied standard has to be diluted to a **standard dilution series**. Reconstitution details and a recommendation for the dilution are given in the **specification data sheet**.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8 °C**.

7. STORAGE AND PREPARATION OF SAMPLES

- Suitable samples are dried capillary blood spots on DrySpot-ID filter paper. (catalogue no. DZ9020ID) DrySpot-ID is the only carrier for dried blood samples that can be used. The dried blood spots are stable for 3 months at 2–8 °C.
- For each sample, one dried blood spot is punched out of the card (two for duplicates) and put into the corresponding well of the plate. The size of the dried blood spots is 1/8" / 3.2 mm and equates to 3 µl whole blood.
- Not needed elution plate wells can be stored covered.

8. TEST PROCEDURE

We recommend to carry out the tests in duplicate.

1.	Put elution plate on 96-well plate.
2.	Put dried blood spots from samples and controls (CTRL) in elution plate wells , as well as 30 µl freshly diluted standards (STD).
3.	Mix internal standard (INT STD) and reduction solution (REDSOL) at the ratio of 2:1 , e.g. 1000 µl INT STD + 500 µl REDSOL.
4.	Add 60 µl of the mixture to each well.
5.	Shake for 30 min at room temperature in the dark.
6.	Centrifuge for 2 min at 3000 g.
7.	Remove elution plate and discard it if used up.
8.	Add 200 µl dilution reagent (DIL) to the eluate.
9.	Cover 96-well plate with aluminium foil and press it on tightly to prevent evaporation.
10.	Put 96-well plate in LC-MS/MS-System.
11.	Inject 3 µl.

9. CHROMATOGRAPHIC CONDITIONS

HPLC method

Column: Atlantis™ HILIC Silica 2.1 x 50 mm, 3 µm (Waters 186002011)

Flow: 300–350 µl/min

Column temperature: 30°C

Injection volume: 3 µl

Gradient:

Time (min)	% A	% B	Flow rate [µl/min]
0.0	95	5	300
0.5	95	5	300
4.5	70	30	350
5.0	60	40	350
7.0	95	5	350

We recommend to use a guard column/filter to extend column's life. The guard column cartridge (KM7000VS) and guard column holder (KM7000VH) can be ordered separately from Immundiagnostik.

In addition, we recommend to use a shift valve to preserve the mass spectrometer; the first 2.5 min of each run can then go to the waste.

After the analysis, the column should be washed with acetonitril at 300 µl/min for about 30 min.

10. MS/MS METHOD

The parameters for the MS/MS method are listed as examples for two machines in the following table.

Column A shows the parameters for a **Waters Micromass Quattro Ultima Tandem mass spectrometer**.

Column B shows the parameters for a **Waters XEVO TQ MS**.

Parameter	A	B
Mode:	MRM	MRM
Polarity:	ESI+	ESI+
Capillary (kV):	3,5	3,0
Cone (V):	20	20
Extracor (V):	3	3
RF lens (V):	3	–
Source temperature (°C):	100	150
Desolvation temperature (°C):	250	600
Cone gas flow (L/Hr):	120	20
Desolvation gas flow (L/Hr):	700	100

MRM transitions (m/z) for Waters Micromass Quattro Ultima

Homocysteine	136 > 90	Collision energy: 11
DL-d ₄ -homocysteine	140 > 94	Collision energy: 11

MRM transitions (m/z) for Waters XEVO TQ MS

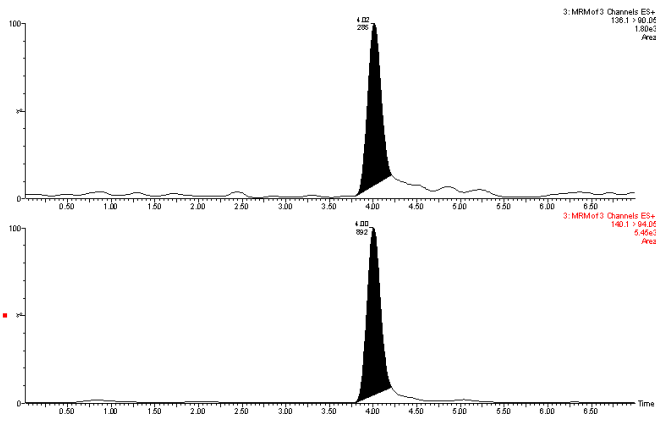
Homocysteine	136 > 90	Collision energy: 12
DL-d ₄ -homocysteine	140 > 94	Collision energy: 10

11. CALCULATION

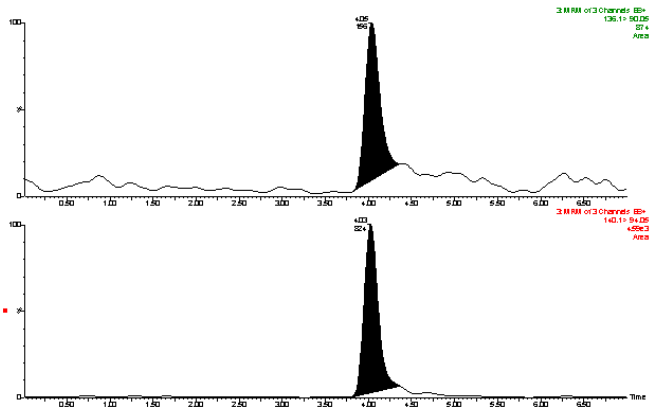
Linear regression in consideration of the internal standard can be used as model for evaluation of the results. The standard concentration points are connected by a straight line. The samples can be calculated using the obtained line.

12. CHROMATOGRAM EXAMPLES

Sample



Calibrator



13. QUALITY CONTROL

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Reference range (whole blood)

< 8 µmol/l	no increased homocystein-dependent risk
8–10 µmol/l	borderline values. Negative effects, for example by influence of coagulation, already possible. Increased risk not to be ruled out, therapy recommended.
10–15 µmol/l	increased homocysteine level with aggressive vascular effects; clearly increased risk, e.g. for vasoconstriction in the carotis, shown by studies. Therapy necessary.
> 15 µmol/l	clearly increased homocysteine level with clearly increased risk for atherosclerosis in the heart, brain, peripheral arteries, increased risk for thromboembolism; therapy absolutely necessary. Duplication of risk for Alzheimer's and Parkinson's disease.

Based on Immundiagnostik studies of samples of apparently healthy persons (n = 9), a normal range of 2.8–7.9 µmol/l was estimated.

We recommend each laboratory to establish its own reference range.

14. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra-Assay CV

4.8 % (19.8 µmol/l) [n = 10]

5.1 % (25.5 µmol/l) [n = 10]

Inter-Assay CV

9.6 % (8.99 µmol/l) [n = 5]

Detection limit

Detection limit of homocysteine: 0.42 µmol/l

Please note that the determination of the detection limit depends not only on the application method but also on the instrument.

15. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.

- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- The activation solution consists of acid. It must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

16. TECHNICAL HINTS

- Quality control samples should be analyzed with each run.
- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- The assay should always be performed according the enclosed manual.

17. DISPOSAL

- The mobile phases (MOPHA A, MOPHA B), standard dilution solution (SOL), dilution reagent (DIL) and activation solution (ACTSOL) must be disposed as non-halogenated solvents.

18. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- *IDK*® is a trademark of Immundiagnostik AG.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

19. REFERENCES

<http://www.deutsche-gefaessliga.de/homocystein.html>

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



To be used with



Manufacturer



Contains sufficient for <n> tests



Lot number



Use by



Attention