



LEVERANTÖR AV CE-MÄRKTA DIAGNOSTISKA KIT.

MASSDETECT™ PETH

INSTRUKTIONER FÖR ANVÄNDNING
FÖR BESTÄMNING AV FOSFATIDYLETANOL 16:0/18:1 I BLOD.

CE

CE-IVD märkt enligt European Directive 98/79/EC

Innehåll

1. FOSFATIDYLETANOL, MASSDETECT™ PETH, LC-MS/MS KIT	2
2. AVSEDD ANVÄNDNING	2
3. INTRODUKTION	2
4. PRINCIPER FÖR ANALYSMETODEN	3
5. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER	3
6. HÄLSO- OCH SÄKERHETS- ÅTGÄRDER	3
7. KIT INNEHÅLL	4
8. FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN	4
9. MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED I KITET	4
10. PREPARATION AV MOBILFASERNA	4
11. KROMATOGRAFI LC-MS/MS METOD	4
12. ÖVERGÅNG	5
13. GRADIENT	5
14. TVÄTTLÖSNING:	5
15. UPPSTARTSPROCESS:	5
16. PROV – FÖRVARING OCH TRANSPORTERING	5
17. PREPARATION EXTRAKTIONSÖSNING	6
18. PROVPREPARATION	6
19. KALIBRATORCURVAN	6
20. BESTÄMNING AV PETH KONCENTRATIONER	6
21. KVALITETSKONTROLL	7
22. PRESTANDA	7
23. REFERENS INTERVALL	8
24. REFERENSER	8
25. BILAGA 1	9

1. FOSFATIDYLETANOL, MASSDETECT™ PETH, LC-MS/MS KIT

Art.nr. 50-2002, 200 analyser inkluderat kolonn

Art. Nr. 50-2001, 200 analyser, ersättnings kit

US Pat. 9499572, 9784701

EP 2992334

Tillverkare

redhot diagnostics AB
Forskargatan 20J
SE-151 36 Södertälje
Sweden
www.redhotdiagnostics.com

2. AVSEDD ANVÄNDNING

Den beskrivna LC-MS/MS applikationen är avsedd för en kvantitativ bestämning av av fosfatidyletanol, (PEth), 16:0/18:1.

Metoden används för att analysera långvarigt intag av alkohol, eller för att påvisa abstinens.

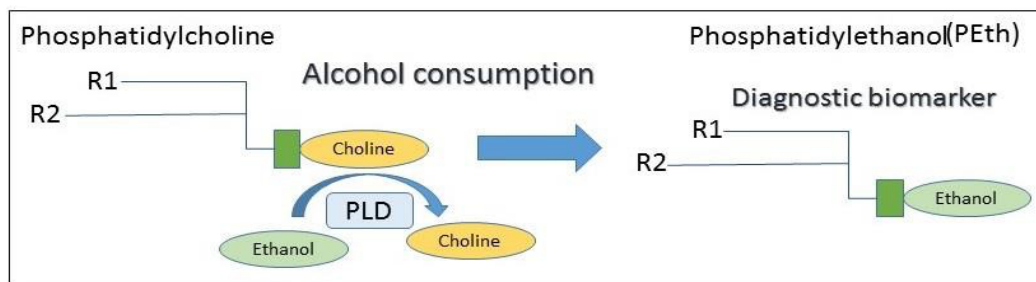
Metoden är avsedd för användning av professionell personal på laboratorier. F

ör in vitro-diagnostisk användning

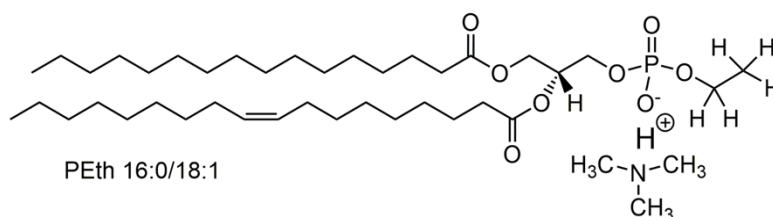
3. INTRODUKTION

Phosphatidyletanol (PEth) i blod är en biomarkör för alkoholkonsumtion (1). Alkoholkonsumtion kan ge upphov till ett flertal olika symptom (2). Att analysera PEth i blodet på patienter är därför en början för att kunna ge personen en adekvat diagnos.

PEth är en onaturlig fosfolipid som endast bildas i närvaro av etanol, vilket ger en teoretisk diagnostisk specificitet på 100 % som biomarkör för alkoholkonsumtion.



Principen för in vivo-generering av PEth beror på att fosfatidylkolin i närvaro etanol och fosfolipas D omvandlas till fosfatidyletanol.



PEth-16:0/18:1 är den vanligaste individuella formen av PEth-homologer (3) men det finns individuella variationer (4). PEth 16:0/18:1 har accepterats som den bästa formen för att använda i kvantitativ LC-MS/MS-analys för att uppskatta alkoholkonsumtion. Det finns ett direkt samband mellan alkoholkonsumtion och nivåerna av PEth i blodet(5,6).

PEth är den enda biomarkör som ger en direkt korrelation till alkoholkonsumtion, den har visat sig vara en känsligare indikator på alkoholkonsumtion än andra markörer (7, 8). Halveringstiden för PEth i omlopp är tre till åtta dagar, vilket innebär att PEth kan detekteras upp till 4 veckor efter att etanol har avlägsnats från kroppen.

PEth har visat sig vara mycket användbar då det är svårt att bestämma alkoholkonsumtionen i en individ (9).

Testet som utvecklats av redhot diagnostics är en kvantitativ test som är robust med hög specificitet och känslighet.

4. PRINCIPER FÖR ANALYSMETODEN

Fosfatidyletanol extraheras från blod genom att 20 µL blod sätts till 150 µL extraktionslösning inklusive interna standard. Efter blandning centrifugeras röret och en del av supernatanten injiceras i LC-MS-systemet. Komponenterna separeras på en kolonn (art.nr 52015) med användning av en binär gradient. Utflödet från kolonnen övervakas med elektroprayjoniseringsmasspektrometri med användning av multipelreaktionsövervakning (MRM) för att följa de respektive karakteristiska övergångarna för PEth och den interna standarden. Förhållandena mellan de kromatografiska toppareorna för PEth och den interna standarden används för att kvantifiera koncentrationen av PEth i proverna.

5. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

Material som ingår i detta kit ska inte användas efter utgångsdatumet på kitets etikett.

Reagens eller substrat som ingår i detta kit ska inte blandas eller ersättas med reagens eller substrat från andra kit.

Försiktighetsåtgärder ska vidtas när extraktionslösning och mobilfaser hanteras.

6. HÄLSO- OCH SÄKERHETS- ÅTGÄRDER

Använd lämpliga ögon-, hand- och ansiktsskydd när du hanterar bodprover. När analysen är avslutad, se

till att kassera rester i enlighet med laboratoriets föreskrifter

7. KIT INNEHÅLL

Art.nr 50–2001, 200 bestämningar, inkl. kolonn

Art. no. 50–2002, 200 bestämningar, ersättnings kit

Komponent	Kvantitet
Kalibrator I blod 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 och 1 och μM	7 x 0.2 ml
D5-PEth 16:0/18:1, 4.5 nmol	0.5 ml
Extarktionslösning	44.5 ml
Inställningslösning	0.5 ml
Kolonn	1 st.

8. FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN

Reagensen ska förvaras i kyl, +2-8°C

Kalibratorn ska förvaras fryst, -20°C

Öppnat kit ska förvaras i +2-8°C och har då en hållbarhet på 6 veckor

Stabilitet vid användning enligt Isaksson et al.(8)

9. MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED I KITET

- LC-MS/MS utrustning
- Mobil fas A
- Mobil fas B
- Vortex-blandare
- Centrifug
- Pipetter
- Vialer
- Bilaga 1 listar produkter som finns tillgängliga för PEth metoden

10. PREPARATION AV MOBILFASERNA

Mobilfas A

5 mM ammonium acetate in vatten	Preparation av 1 000 mL
Ammonium acetat	1 mL 5 M ammonium acetate
Milli-Q vatten	999 mL

Mobilfas B

10% 2-propanol i 90% metanol	Preparation av 1 000 mL
Metanol	900 mL
2-propanol	100 mL

11. KROMATOGRAFI LC-MS/MS METOD

Som ett exempel för Sciex API5500

Instrument	Sciex API5500
Ionization	Electrospray

Scan Type	MRM
Polarity	ESI-
Curtain Gas	10
Collision Gas	8
Ion Spray Voltage (kV)	-4500
Temperature	500
Ion Source Gas 1	40
Ion Source Gas 2	40
DP (declustering potential)	150 – 220
CE (collision energy)	38 - 40

12. ÖVERGÅNG

Molekyl	Övergång
PEth 16:0/18:1	701.5 > 281.2, 255.6
PEth-d5 16:0/18:1	706.5 > 281.2, 255.6

Fragment 281 används för att kvantifiering och 255 som kvalitet

13. GRADIENT

Flödes hastighet: 0.4 mL/min

Analys tid: 3.5 min

Tid [min]	Mobil fas A [%]	Mobil fas B [%]
0-0.2	30	70
0.2-1.5	0	100
1.5-2.5	0	100
2.5-2.6	30	70

14. TVÄTTLÖSNING:

Den fettlösliga egenskapen hos PEth gör att den lätt fastnar i autosamplern. Vi rekommenderar att autosamplern tvättas. regelbundet med en blandning av 2-propanol, metanol och ammoniumacetat.

15. UPPSTARTSPROCESS:

Använd den medföljande **PEth-inställningslösningen** för att hitta de exakta övergångarna för MRM-spåren när du använder kitet för första gången.

PEth ioniserar och fragmenteras lätt beroende på instrumentparametrarna. MS svaret kan bli för hög för multiplikatorn, om det är så minska injektionsvolymen eller späd ut proverna.

Kontrollera noggrannheten på masskalorna efter underhåll av masspektrometern, eller om instrumentet har påverkats på andra sätt som påverkar masspektrometerns noggrannhet.

16. PROV – FÖRVARING OCH TRANSPORTERING

Analys utförs i blod: Använd endast EDTA-rör. NOTERA! Centrifugera inte! Blanda provet i en blodvagg eller genom att vända det upp och ner tio gånger direkt efter provtagningen för att förhindra proppar i röret. Om transport till laboratoriet inte kan ordnas omedelbart ska provet förvaras i kylskåp. Hållbarhet i kylan: 1 vecka. Transport sker utan kylning. För längre lagring rekommenderas -20°C.

Extraherade prover förvaras vid +2-8oC med en hållbarhet på två veckor.

Låt prover och reagens nå rumstemperatur före användning.

17. PREPARATION EXTRAKTIONSÖSNING

Centrifugera ampullerna som innehåller internstandard D₅-PEth 16:0/18:1 (2000 RCF, 2 min) innan de öppnas. Öppna IS ampullen och tillsätt 0,5 ml extraktionslösning., överför till lösningen till extraktions flaska, upprepa 2 gånger för att kvantitativt överföra den interna standarden. Slutkoncentrationen av D₅-PEth 16:0/18:1 intern standard i är 0.1 µM.

18. PROVPREPARATION

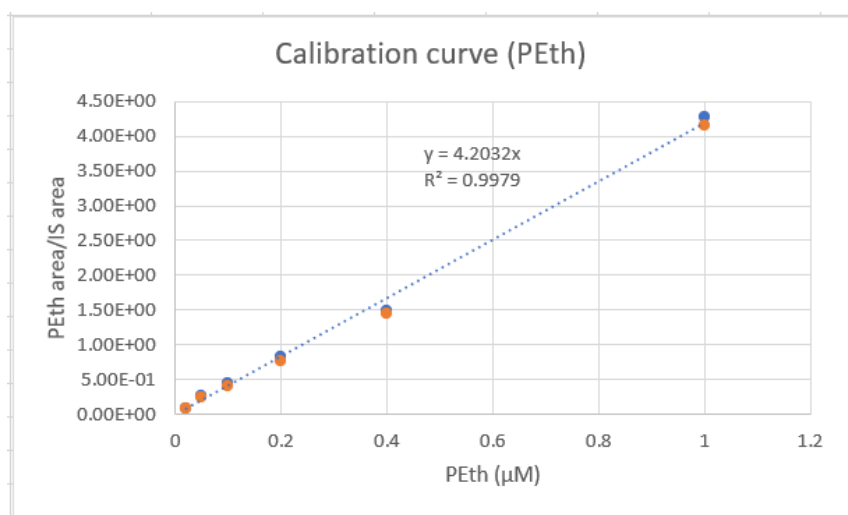
1. Till 20 µL blod sätt till 150 µL extraktionslösning skaka på vortex i 2 x 5 sek.
2. Centrifugera rören 10 min i rumstemperatur, 16400 RCF i 10 min, om möjligt vid 10°C
3. Supernatanten förs över i injektionsrör, injicera 20 µL av provet i instrumentet

19. KALIBRATORKURVAN

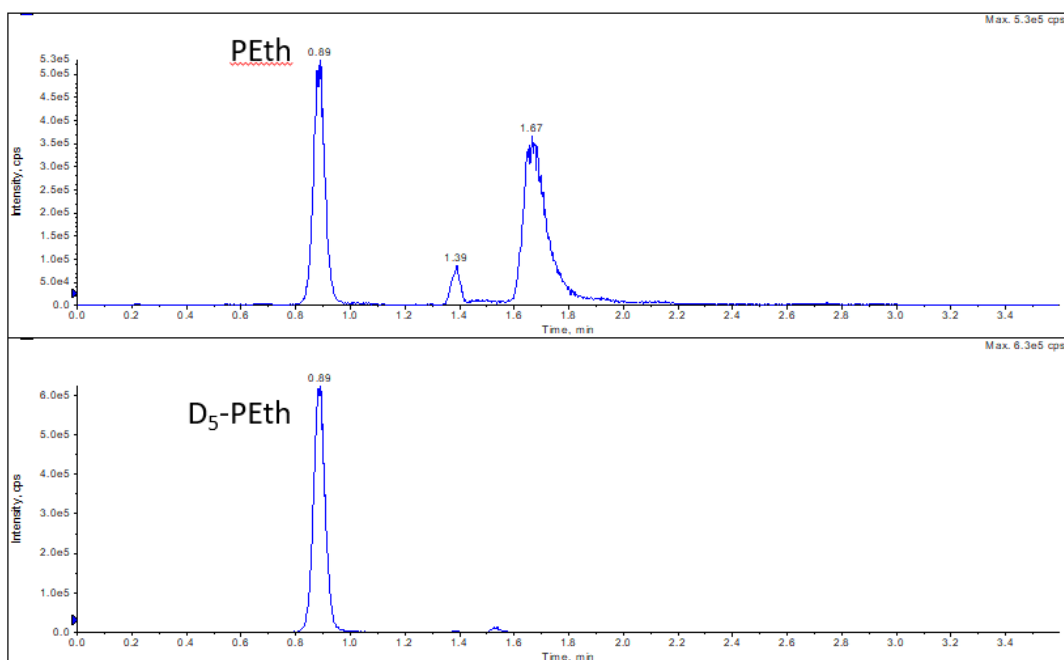
Kalibratorkurvan är preparerad i blod och redo att användas, se punkt 18.

20. BESTÄMNING AV PETH KONCENTRATIONER

Toppareorna för analyterna är dividerade med toppareorna för den interna standarden, och förhållandena (svaren) används för responsen kontra koncentrationen av analyten i kalibreringsproverna. Första ordningens linjära regression viktad med 1/x är att föredra



Figur 2. Kalibratorkurva baserat på 701,5 -> 281,2

Figur 3. Kontrollprov, 0.5 μ M

21. KVALITETSKONTROLL

Kontrollprovet bör analyseras med varje analysomgång. Resultat som genereras från analysen av kontrollprover bör utvärderas med statistiska metoder för att säkerställa att metoden visar korrekta resultat. Området för den interna standarden bör vara jämnt. Om området inte är det, är det ett tecken på störningar och/eller överföringseffekter. En systematisk minskning av ytan för interna standard under flera analysomgångar kan indikera hårdvarurelaterade problem som kontaminerad kolonn eller jonkälla. Individuella extremvärden kan indikera problem med provet eller beredningen av provet.

Arean för den interna standarden bör vara densamma i alla prover, om den inte är det, är det ett tecken på interferens eller att en felaktig volym är tillsatt. Se nedan reproducerbarhet.

Kontrollprov kan beställas från redhot diagnostics se bilaga 1.

22. PRESTANDA

Mätområde

0.02 – 1.0 μ M

Lägsta detektionsnivå

0.02 μ M

Reproducerbarhet

PEth [μ mol/L]	Intra Assay CV (%) (n=10)
0.034	16
0.27	10
0.74	5

23. REFERENS INTERVALL

PEth [$\mu\text{mol/L}$]	PEth [$\mu\text{g/L}$]	Kommentar
< 0.03	<20	Ingen eller låg konsumtion
0.03 – 0.3	20 – 200	Moderat konsumtion
> 0.3	>200	Hög konsumtion

24. REFERENSER

1. Viel G, Boscolo-Berto R, Cecchetti G, Fais P, Nalesso A, Ferrara SD. Phosphatidylethanol in blood as a marker of chronic alcohol use: A systematic review and meta-analysis. *Int.J.Mol.Sci* 2012, 13, 14788-14812
2. Rehm, J. The risks associated with alcohol use and alcoholism. *Alcohol Res. & Health* 2014 (34): 135-143.
3. Gnann H, Engelmann C, Skopp G, Winkler M, Auwärter V, Dresen S, Ferreirós N, Wurst FM, Weinmann W. Identification of 48 homologues of phosphatidylethanol in blood by LC-ESI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2010, 396(7):2415-23.
4. Stenton J, Walther L, Hansson T, Andersson A, Isaksson A. Inter Individual Variation and Factors Regulating the Formation of Phosphatidylethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2019 Nov;43(11):2322-2331
5. Helander A. and Zheng Y. Molecular Species of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol in Human Blood Measured by LC-MS. *Clinical Chemistry* 2009, 55(7):1395-1405.
6. Helander A., Hermansson U., Beck O Dose-Response Characteristics of the Alcohol Biomarker Phosphatidylethanol (PEth)-A Study of Outpatients in Treatment for Reduced Drinking. *Alcohol Alcohol.* 2019 Dec 1;54(6):567-573
7. Kechagias S, Dernroth DN, Blomgren A, Hansson T, Isaksson A, Walther L, Kronstrand R, Kågedal B, Nystrom FH. Phosphatidylethanol Compared with Other Blood Tests as a Biomarker of Moderate Alcohol Consumption in Healthy Volunteers: A Prospective Randomized Study. *Alcohol Alcohol.* 2015 Jul;50(4):399-406.
8. Neuman, J., Beck, O., Helander, A. and Böttcher, M. Performance of PEth compared with other alcohol biomarkers in subjects presenting for occupational and pre-employment medical examination. *Alcohol and Alcoholism*, 2020, 55 (4), 401 - 408
9. Jain, J., Evans, J., Page, K. and Hahn, J. Comparison of phosphatidylethanol results to self-reported alcohol consumption among young injection drug users. *Alcohol* 2014, 49(5) 520- 524
10. Swedish Transport Agency, Översyn alcohol, narkotika och läkemedel. Dnr TSV 2020-8962

25. BILAGA 1

50-1011	PEth Calibrator curve in blood	ready in blood 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, μM , 0.2 mL
50-1021	PEth-d5 16:0/18:1 int.std. 10 nmol	10 nmol
50-1023	PEth-d5 16:0/18:1 int.std. 100 nmol	100 nmol
51-1008	QC sample high PEth	5x 0,5 mL
51-1009	QC sample low PEth	5x 0,5 mL
51-1017	QC sample medium PEth	5x 0,5 mL
50-2003	PEth LC-MS/MS kit 500 analyzes	Incl Column
50-2004	PEth LC-MS/MS kit - 500 analyzes	Replacement kit
50-2005	PEth LC-MS/MS kit - 1 000 analyzes	Incl Column
50-2006	PEth LC-MS/MS kit 1 000 analyzes	Replacement kit

Products for blood sampling

10-5001	PEth - rhelise	1 pcs sampling kit
10-5010	PEth - rhelise	10 pcs sampling kit
10-5050	PEth - rhelise	50 pcs sampling kit