



**LEVERANTÖR AV CE-MÄRKTA DIAGNOSTISKA KIT.**

**MassDetect™ MMA**

**Instruktion för in vitro-bestämning av metylmalonsyra i blod/plasma.**



CE-IVD märkt enligt Europeiska Direktivet 98/79/EC

## Innehåll

1.	METYLMALONSYRA LC-MS/MS KIT .....	2
2.	AVSEDD ANVÄNDNING .....	2
3.	INTRODUKTION .....	3
4.	PRINCIPERNA FÖR ANALYSMETODEN .....	3
5.	FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER. ....	3
6.	HÄLSO- OCH SÄKERHETSÅTGÄRDER .....	3
7.	INGÅENDE KOMPONENTER .....	3
8.	FÖRVARING .....	4
9.	MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER KITET .....	4
10.	BEREDNING AV MOBILFASER .....	4
11.	KROMATOGRAFI FÖRHÅLLANDE LC-MS/MS-METOD (EXEMPEL) .....	4
12.	MOLEKYL JON OCH FRAGMENT FÖR ANALYTERNA .....	5
13.	LC-GRADIENT .....	5
14.	TVÄTTLÖSNING .....	5
15.	OPTIMERING AV PARAMETRAR FÖR ANALYTERNA .....	5
16.	PROVLAGRING OCH TRANSPORTFÖHÅLLANDEN .....	5
17.	BEREDNING AV INTERNSTANDARD I EXTRAKTIONSLÖSNINGEN .....	5
18.	PROVBEREDNING .....	6
19.	BEREDNING AV KALIBRERINGSKURVA .....	6
20.	KONCENTRATIONSBESTÄMNING AV MMA .....	6
21.	KVALITETSKONTROLL .....	8
22.	PRESTANDA .....	8
23.	REFERENSNIVÅER FÖR MMA .....	8
24.	REFERENSER .....	8
25.	BILAGA 1 .....	9

### 1. METYLMALONSYRA LC-MS/MS KIT

Art. Nr. 40–2001, 100 analyser inkluderat kolonn

Art. Nr. 40–2002, 100 analyser, ersättningsförpackning

Riskklass 1 enligt IVDD och riskklass A enligt IVDR

Globalt Artikel Nummer (GTIN) 07350143680007

#### Tillverkare

redhot diagnostics AB

Forskargatan 20J

SE-151 36 Södertälje

Sweden

[www.redhotdiagnostics.com](http://www.redhotdiagnostics.com)

### 2. AVSEDD ANVÄNDNING

Den beskrivna LC-MS/MS-applikationen är avsedd för kvantitativ bestämning av metylmalonsyra (MMA) i blod/plasma.

Metoden används för att utvärdera en förhöjd nivå av MMA vilket är ett mått på B<sub>12</sub> vitaminbrist

För in vitro-diagnostisk användning.

### 3. INTRODUKTION

Metylmalonsyra (MMA) en markör för intracellulär kobalaminbrist (vitamin B<sub>12</sub>). Kobalaminomsättningen är komplex och därmed svår att kemiskt diagnostisera (1). Analysen görs vid utredning av misstänkt kobalamin (vitamin B<sub>12</sub>) brist t. ex. vid oklara neuropsykiatriska symtom och megaloblastisk anemi. Kobalaminbrist i vävnad leder till ökade halter av MMA och homocystein i blod (2). Vid låga nivåer av vitamin B<sub>12</sub> ansamlas MMA i blodet medan normal serumnivå gör kobalaminbrist osannolik.

Andra orsaker till onormala nivåer av MMA kan vara en metabol sjukdom som metylmalonsyraemi. Denna orsakas av ärftliga mutationer i en eller flera gener som kodar för enzymer och proteiner som deltar i omvandlingen av metylmalonyl-CoA till succinyl-CoA.

Brist på vitamin B<sub>12</sub> är ett mycket viktigt folkhälsoproblem eftersom en brist på B vitamin ger svåra komplikationerna om den inte detekteras och behandlas. Att upptäcka riskfaktorer och riskgrupper och utbilda om vitamin B brist skulle förhindra att de får irreversibla komplikationer.

I många länder utförs därför undersökningar på nyfödda som en del i folkhälsoprogrammet (3).

### 4. PRINCIPERNA FÖR ANALYSMETODEN

Metylmalonsyra extraheras från blod genom att provet blandas med en lösning som innehåller internstandard, lösningen skakas och centrifugeras. Supernatanten överförs därefter till ett nytt rör och indunstas till torrhet. En rekonstitutionslösning sätts till och provet överförs till en vial för analys.

Provet separeras på en LC-kolonn med en binär gradient. Flödet från kolonnen leds in i masspektrometern som är inställd för analys av MMA, D<sub>3</sub>-MMA och den interna standarden, <sup>13</sup>C<sub>4</sub>-D<sub>3</sub>-MMA.

Då inget blod är fritt från MMA, används märkt MMA (D<sub>3</sub>-MMA) som surrogatmolekyl. Den märkta molekylen kan efter optimering av MS-parametrar ge samma respons som omärkt MMA. Därmed kan standardkurvan för D<sub>3</sub>-MMA användas vid beräkningen av MMA koncentrationerna.

### 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.

Reagenser som tillhandahålls i detta kit kan vara skadliga om de intas, andas in eller absorberas genom huden. Läs noggrant igenom informationen för varje reagens i säkerhetsdatabladet innan du utför analysen.

### 6. HÄLSO- OCH SÄKERHETSÅTGÄRDER

Använd lämpliga ögon-, hand- och ansiktsskydd när du hanterar blodprover samt när reagensen i kjet används. Analysrester ska hanteras och destrueras i enlighet med laboratoriets föreskrifter.

### 7. INGÅENDE KOMPONENTER

**Art. No. 40-2001 96 analyser, inklusive kolonn**

**Art. No. 40–2002, 96 analyser, ersättnings kit utan kolonn**

Komponenter	Kvantitet
Kalibrator, D <sub>3</sub> -MMA 50 µM	0.5 mL
Internstandard <sup>13</sup> C <sub>4</sub> -D <sub>3</sub> -MMA, 100 µM	0.2 mL
Extraktionslösning	40 mL
Rekonstitueringslösning	20 mL
Optimeringslösning, MMA, <sup>13</sup> C <sub>4</sub> D <sub>3</sub> -MMA, D <sub>3</sub> -MMA och bärnstenssyra, (0.5 µM av varje)	0.5 ml
Kolonn	1 st

## 8. FÖRVARING

Reagensen ska förvaras i kyl, +2-8°C

Kalibratorn ska förvaras fryst, -20°C, när den är utspädd i blod.

## 9. MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER KITET

LC-MS/MS utrustning

Mobilfas A

Mobilfas B

Vortex-blandare

Centrifug

Förkolonn eller förfilter

Injektionsvialer

Bilaga 1 listar produkter som finns för MMA metoden

## 10. BEREDNING AV MOBILFASER

**OBS!** Ättiksyra och myrsyran skall vara av hög kvalitet som lagras i glasflaska.

### Mobilfas A

0.05% ättiksyra i 90% metanol	Beredning av 1 000 ml
Ättiksyra (koncentrerad)	0.5 mL
Metanol	900 mL
Milli-Q vatten	100 mL

### Mobilfas B

0.5% myrsyra i 20% metanol	Beredning av 1 000 ml
Myrsyra (koncentrerad)	5 mL
Metanol	195 mL
Milli-Q vatten	800 mL

## 11. KROMATOGRAFI FÖRHÅLLANDE LC-MS/MS-METOD (EXEMPEL)

Instrument	Sciex API 5500
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)	30 – 45
CE (collision energy)	10 - 14

## 12. MOLEKYL JON OCH FRAGMENT FÖR ANALYTERNA

Substans	M+H <sup>+</sup> > fragment
MMA och bärnstenssyra	116.9 > <b>72.9</b> , 55.2
D <sub>3</sub> -MMA	119.9 > <b>76.0</b> , 58.1
<sup>13</sup> C <sub>4</sub> -D <sub>3</sub> -MMA	124.0 > <b>79.0</b> , 61.0

## 13. LC-GRADIENT

Flödes hastighet: 0.4 mL/min

Analystid: 3.5 min

Tid (min)	Mobilfas A (%)	Mobilfas B (%)
0.0	100	0
0.5	100	0
1.0	0	100
2.0	0	100
2.1	100	0

## 14. TVÄTTLÖSNING

Följ tillverkarens rekommendationer för autoinjektorn. Eftersom mobilfaserna innehåller metanol, vatten och syra så är en blandning av dem att föredra

## 15. OPTIMERING AV PARAMETRAR FÖR ANALYTERNA

Använd den medföljande optimeringslösningen för att ställa in parametrarna för analyterna (M+H<sup>+</sup>, fragment, m.m.), när du använder kitet för första gången.

**OBS!** Särskild noggrannhet behöver ägnas åt att justera responsen för de respektive MMA-varianterna. Det är speciellt viktigt att responsen för D<sub>3</sub>-MMA respektive omärkt MMA är identisk. Om inte, justera parametrarna eller räkna med en faktor.

Kontrollera noggrannheten på masskalorna efter underhåll av masspektrometern, eller om instrumentets noggrannhet kan ha påverkats på annat sätt. Det är viktigt att topparna för bärnstenssyra och MMA är tillräckligt separerade.

## 16. PROVLAGRING OCH TRANSPORTFÖRHÅLLANDEN

Analysen görs på blod/plasma. Använd EDTA rör. Vänd röret direkt efter provtagning 6–10 gånger. Förvara röret stående i 30 min efter provtagning (för att undvika hemolys). Undvik att ställa provrören i direkt solljus.

Hållbarhet vid förvaring och transport från provtagning till ankomst på analyserande laboratorium.

### Ocentrifugerat prov:

Rumstemperatur 15–23 °C, max 4 timmar

### Centrifugering:

Centrifugera provet i 10 min i 2000 G, om inget annat anges i provtagningsanvisningen.

Rumstemperatur 15–23 °C, max 1 dygn

Kylt 4 - 8 °C, max 3 dygn

Frys provet, -20 °C, vid längre än 3 dygns förvaring

## 17. BEREDNING AV INTERNSTANDARD I EXTRAKTIONSLOSNINGEN

Sätt till hela volymen ifrån internstandardröret till extraktionslösningen. Den slutgiltiga koncentrationen av internstandard i extraktionslösningen kommer att vara 0,5 µM.

## 18. PROVBEREDNING

Patient- och kalibreringsprov hanteras på samma sätt.

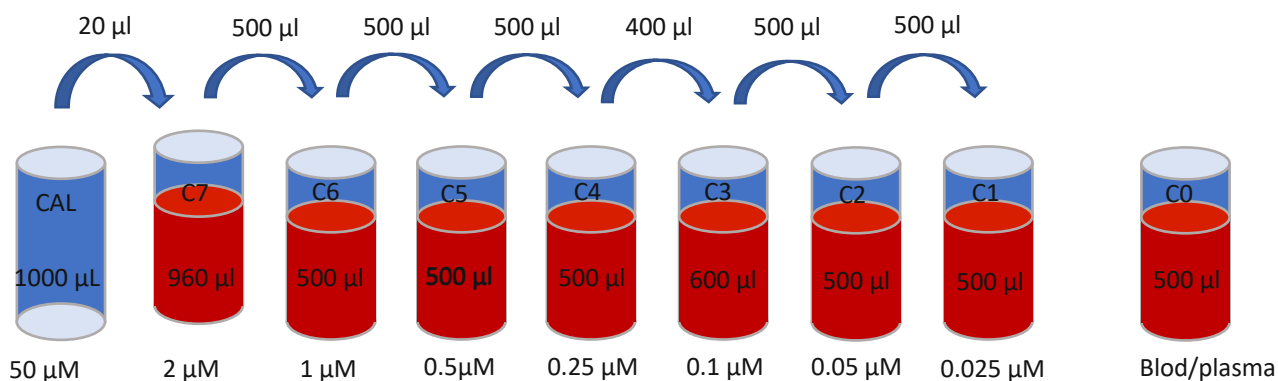
1. Till 50  $\mu\text{L}$  blod/plasma sätt till 250  $\mu\text{L}$  extraktionslösningen som innehåller den interna standarden. Blanda väl (Vortex)
2. Centrifugera 10 min.
3. Indunsta med exempelvis kvävgas
4. Tillsätt 100  $\mu\text{L}$  av REC-lösning
5. För över till injektionsvialer
6. Blir MS topparna för höga, späd proverna med en lämplig volym REC-lösning

## 19. BEREDNING AV KALIBRERINGSKURVA

Kalibreringskurvan görs med  $\text{D}_3\text{-MMA}$ .

Gör en spädningsserie: 40  $\mu\text{L}$  50  $\mu\text{M}$  kalibreringslösning,  $\text{D}_3\text{-MMA}$ , blandas med 960  $\mu\text{L}$  blod, vilket ger en koncentration av 2.0  $\mu\text{M}$  (C7 i tabellen nedan). Fortsätt med återstående kalibreringspunkter enligt tabell.

Kalibreringspunkt	Kalibreringskonc. ( $\mu\text{M}$ )	Lösning	Volym ( $\mu\text{L}$ )	Volym (blod/plasma) ( $\mu\text{L}$ )	Total volym ( $\mu\text{L}$ )	Kvarvarande volym ( $\mu\text{L}$ )
C7	2.0	CAL	40	960	1000	500
C6	1.0	C7	500	500	1000	500
C5	0.5	C6	500	500	1000	500
C4	0.25	C5	500	500	1000	600
C3	0.1	C4	400	600	1000	500
C2	0.05	C3	500	500	1000	500
C1	0.025	C2	500	500	1000	1000
C0	0			500	500	500



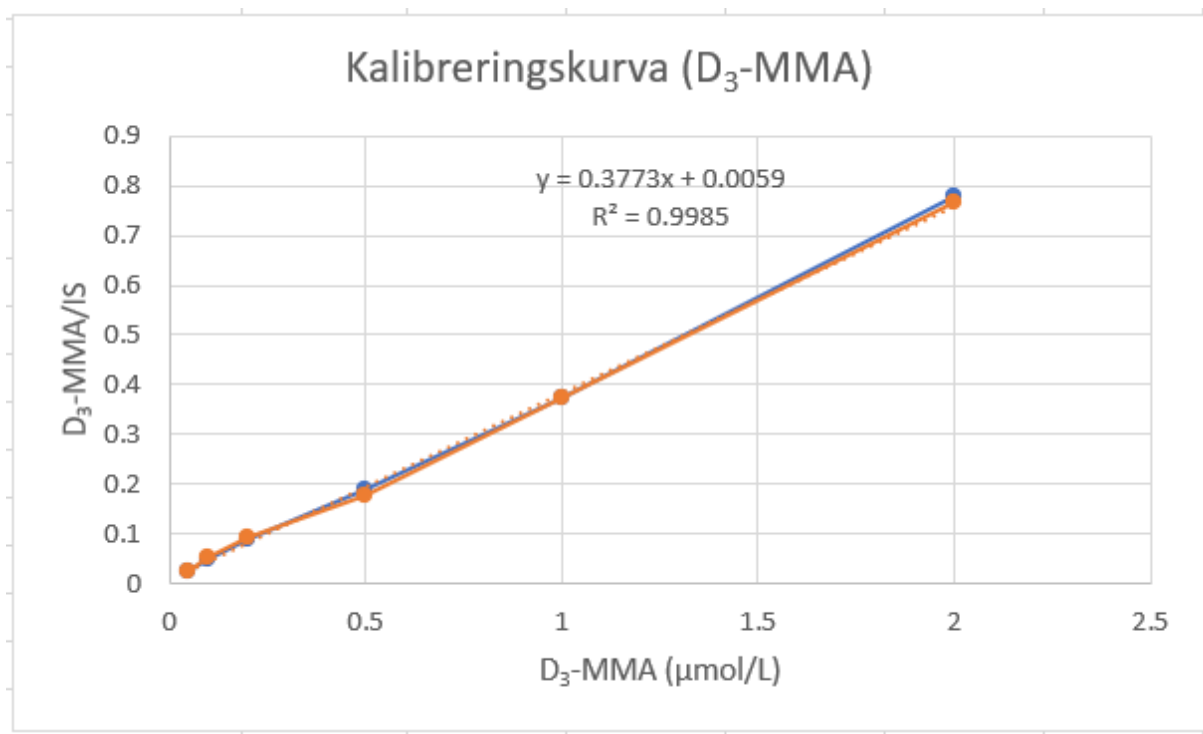
## 20. KONCENTRATIONSBESTÄMNING AV MMA

$\text{D}_3\text{-MMA}$  används som surrogatanalyt eftersom blod och plasma redan innehåller MMA

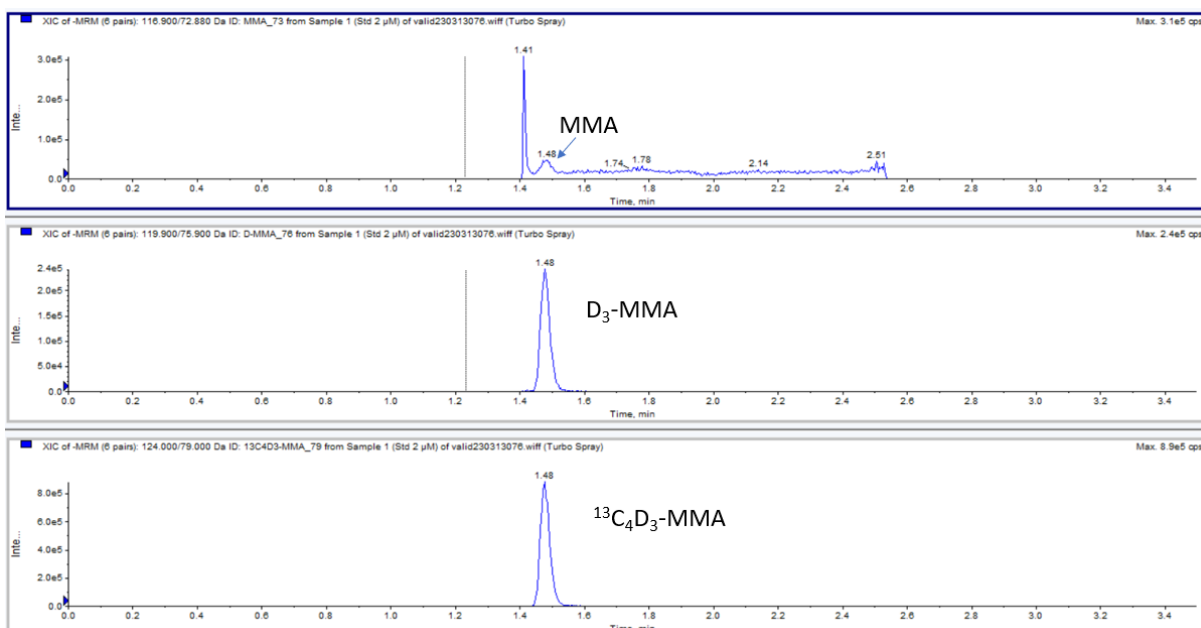
För att göra det möjligt att använda en kalibreringskurva baserad på  $\text{D}_3\text{-MMA}$  för kvantifiering av MMA i blod, måste båda molekylernas MS-respons vara identisk. Även om  $\text{D}_3\text{-MMA}$  har samma struktur och kemiska egenskaper som MMA kan MS-parametrarna, framför allt kollisionenergierna, behöva justeras för att ge samma MS-respons (se även "9. Optimering av parametrar för analyterna"). I varje mätpunkt relateras topparean för respektive analyt, mot motsvarande topparea för den interna standarden ( $\text{D}_3\text{-MMA}$ ).

MMA). Dessa kvoter avsätts mot koncentrationen av D<sub>3</sub>-MMA för beräkning av kalibreringskurvans ekvation, som används vid bestämning av provernas MMA-koncentration. Första ordningens linjära regression viktad med 1/x är att föredra.

Nedre kvantifieringsgräns (LOQ) är 0,025 µmol/L.



Figur 1. Högsta kalibreringspunkt är 2µM



Figur 2. Eftersom bärnstenssyratoppen är mycket högre än MMA toppen så kan det vara svårt att integrera MMA. Låt därför flödet gå till slask till dess att MMA t i stort sett eluerat ut. Då kommer inte bärnstenssyran att störa integreringen av MMA toppen lika mycket, vilket kan ses i figuren.

## 21. KVALITETSKONTROLL

Kontrollprover bör inkluderas i varje analysomgång. Resultat som genereras från analysen av kontrollproverna bör utvärderas med statistiska metoder för att säkerställa att metoden visar korrekta resultat.

MS-responser (toppareorna) för den interna standarden bör vara lika stor för varje prov inom en analysomgång. Större avvikelser är ett tecken på interferens eller att en felaktig volym är tillsatt. Den märkta internstandardens kompenserar för volymskillnader efter indunstning och injektionsvolym. En systematisk minskning av topparean för internstandardens över flera olika analysomgångar kan indikera hårdvarurelaterade problem, som kontaminerad kolonn eller jonkälla. Individuella extremvärden kan indikera problem med provet eller beredningen av provet.

Kontrollprover kan beställas från redhot diagnostics, Bilaga 1

## 22. PRESTANDA

### Mätområde

0.025 – 2.0 µmol/L

Prov som innehåller mer än 2.0 µmol/L ska spädas och analyseras igen

### Lägsta detektionsnivå

Detektionsnivå (lägsta kalibratornivå): 0.025 µM

### Reproducerbarhet

*Reproducerbarhet av QC-prov i blod*

QC nivå (µM)	% standardavv. (n=4)
0.075	8.9
0.75	5.8
1.5	4.0

## 23. REFERENSNIVÅER FÖR MMA

Enligt Karolinska Universitetssjukhus, se även ref. 11.

<0.28 µmol/L för personer under 50 år

<0.36 µmol/L för personer som är över 50 år

## 24. REFERENSER

1. Green, R. et al. Vitamin B12 deficiency. Nature Review. 2017, 3, 1-19
2. Guney, T. et al. Epidemiology of vitamin B12 Deficiency. Epidemiology of Vitamin B12 Deficiency. <http://dx.doi.org/10.5772/63760>, 2016, Cpt 16, 103-112.
3. Wilsdon, T. et al. A landscape assessment of newborn screening (NBS) in Europe. CRA Insights: Life Science. 2021, 1-12.
4. Hannibal, L. et al. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. Frontiers in Molecular Sciences. 2016, 3, 1- 16.
5. Aparicio-Ugarriza, R. et al. A review of the cut-off points for the diagnosis of vitamin B12 deficiency in the general population. Clin. Chem. Lab Med 2015; 53(8): 1149–1159



## **25. BILAGA 1**

- 40-1006 MMA QC low
- 40-1007 MMA QC mid
- 40-1008 MMA QC high