



LEVERANTÖR AV CE-MÄRKTA LC-MS/MS DIAGNOSTISKA KIT

MASSDETECT™ MMA

INSTRUKTIONER FÖR IN VITRO BESTÄMNING AV METYLMALONSYRA I PLASMA/SERUM

CE

CE-IVD label according to European Directive 98/79/EC

Innehåll

1.	METHYLMALONSYRA 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.	KIT INNEHÅLL.....	3
8.	FÖRVARING	4
9.	MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER I KITET	4
10.	PREPARERING AV MOBILFASER.....	4
11.	MS/MS METOD (EXEMPEL)	4
12.	TRANSITIONER.....	4
13.	LC-GRADIENT	5
14.	TVÄTTLÖSNING.....	5
15.	UPPSTART-OPTIMERING AV MS PARAMETRAR FÖR ANALYTERNA.....	5
16.	PROV – LAGRING OCH TRANSPORTFÖRHÅLLANDEN	5
17.	PREPARERING AV EXTRAKTIONSLÖSNING MED INTERNSTANDARD	5
18.	PROVUPPARBETNING	5
19.	KALIBRERINGSKURVA	6
20.	BESTÄMNING AV KONCENTRATIONEN AV MMA I PROVER	6
21.	KVALITETSKONTROLL.....	7
22.	PRESTANDA	7
23.	REFERENSNIVÅER FÖR MMA.....	7
24.	REFERENSER	7
25.	APPENDIX 1	8

1. METHYLMALONSYRA LC-MS/MS KIT

Art. No. 40-2002, 150 analyser inklusive kolumn.

Art. No. 40–2001, 150 analyser, ersättnings kit.

Riskklass 1 enligt IVDD och riskklass A enligt IVDR

Globalt artikelnummer (GTIN) 07350143680007

Tillverkare

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

2. AVSEDD ANVÄNDNING

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

Metylmalonsyra (MMA) är en biomarkör för vitamin B₁₂ brist. Förhöjda nivåer av MMA är ett resultat av ärftliga defekter av enzymer eller förvärvade brister av vitamin B₁₂

MMA är också en specifik diagnostisk markör för den grupp av sjukdomar som gemensamt kallas metylmalonsyraemi, som inkluderar minst 7 olika komplementgrupper.

Den här metoden är avsedd att användas av professionell laboratoriepersonal på sjukhuslaboratorier

För in vitro-diagnostisk användning

3. INTRODUKTION

Metylmalonsyra (MMA) är en markör för intracellulär kobalamin (vitamin B12)-brist. Kobalaminmetabolismen är komplex och därmed svår att kemiskt diagnostisera (1). Analysen görs när man utreder misstänkt kobalamin (vitamin B12) brist, t.ex. vid oklara neuropsykiatriska symtom och megaloblastisk anemi. Kobalaminbrist i vävnad leder till ökade nivåer av MMA och homocystein i blodet (2). Vid låga nivåer av vitamin B12 ackumuleras MMA i blodet, medan normala serumnivåer gör kobalaminbrist osannolik. Andra orsaker till onormala nivåer av MMA kan vara en metabolisk störning som metylmalonsyraemi. Detta orsakas av ärvda mutationer i en eller flera gener som kodar för enzymer och proteiner som är involverade i omvandlingen av metylmalonyl-CoA till succinyl-CoA. Brist på vitamin B12 är ett mycket viktigt folkhälsoproblem eftersom en brist på vitamin B12 orsakar allvarliga komplikationer om det inte upptäcks och behandlas. Att upptäcka riskfaktorer och riskgrupper och utbildas om vitamin B-brist skulle förhindra att de får irreversibla komplikationer. I många länder. I många länder, tar prov därför på nyfödda som en del av folkhälsoprogrammet (3).

4. PRINCIPERNA FÖR ANALYSMETODEN

Metylmalonsyra extraheras från plasma/serum genom att provet blandas med en fällningslösning som innehåller internstandard, lösningen skakas och centrifugeras. Supernatanten överförs till ett nytt rör, indunstas till torrhet, rekonstitueringslösningen tillsätts och provet överförs till injektionsvial för analys.

Provet separeras på en LC-kolonn med hjälp av en binär gradient. Flödet från kolonnen detekteras med ett MS/MS instrument i negativ mode för att detektera MMA, D₃-MMA och den interna standarden, ¹³C₄-D₃-MMA.

Eftersom inget blod är fritt från MMA används D₃-MMA som en surrogatmolekyl. D₃-MMA kan ofta efter optimering av MS-parametrarna få samma MS respons som MMA. Men om det inte är möjligt får man i stället kompensera genom att använda kvoten av responsfaktorerna vid beräkningen. Sålunda görs en kalibreringskurva av D₃-MMA i plasma/serum med ¹³C₄-D₃-MMA som internstandard för att mäta MMA koncentrationerna i proverna.

5. FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER.

Material som ingår i detta kit ska inte användas efter utgångsdatumet på kitets etikett. Lösningar som ingår i detta kit ska inte blandas eller ersättas med lösningar från andra kit.

6. HÄLSO- OCH SÄKERHETSÅTGÄRDER

Vänligen använd lämpliga ögon-, hand- och ansiktsskydd när du hanterar detta material. När analysen är avslutad, se till att kassera rester i enlighet med laboratoriets föreskrifter.

7. KIT INNEHÅLL

Art. No. 40-2001 150 analyser, inkluderat LC- kolonn

Art. No. 40-2002, 150 analyser, ersättnings-kit utan kolonn

Märkning	Komponent	Volym
CAL	Kalibratorkurva i serum 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 och 2.0 µM, D ₃ -MMA	8 x 0.2 mL
IS	Internstandard ¹³ C ₄ D ₃ -MMA, 50 µM	0.2 mL
EXT	Extraktionslösning	40 mL
REC	Rekonstitueringslösning	20 mL
TUN	"Tuning"-lösning, MMA, ¹³ C ₄ D ₃ -MMA, D ₃ -MMA, och bärnstenssyra, (1 µM av varje)	0.5 mL
COL	LC-kolonn	1 st

8. FÖRVARING

Lösningen ska förvaras i kyl, +2-8°C

Kalibratoren ska förvaras fryst, -20°C.

9. MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE MEDFÖLJER I KITET

- Mobilfas A
- Mobilfas B
- Appendix 1 produkter som finns tillgängliga för MMA analyser.

10. PREPARERING AV MOBILFASER

OBS! Ättik- och myrsyra ska vara av god kvalitet och förvaras i glasflaska

Mobilfas A

0,05% ättiksyra in 90% metanol		Preparering av 1 000 mL
Ättiksyra		0,5 mL
Metanol		900 mL
Milli-Q vatten		100 mL

Mobilfas B

0,5% myrsyra in 20% metanol		Preparering av 1 000 mL
Myrsyra		5 mL
Metanol		195 mL
Milli-Q vatten		800 mL

11. 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. TRANSITIONER

Analyt	M+H ⁺ fragment
MMA and BÄRNSTENSSYRA	116.9 > 72.9, 55.2
D ₃ -MMA	119.9 > 75.9, 58.1
¹³ C ₄ D ₃ -MMA	124.0 > 79.0, 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 AV AUTOINJEKTORN

Tvättlösningar skall köras mellan varje injektion.

Första tvättfas: Acetonitril/Metanol/Vatten till 1/1/1 (Valv och post clean 5 sekunder vardera)

Andra tvättfas: Mobilfas A (Se punkt 10) (Valv och post clean 5 sekunder vardera).

15. UPPSTART-OPTIMERING AV MS PARAMETRAR FÖR ANALYTERNA

Använd den medföljande "tuning"lösningen (TUN) för att optimera respektive analyters MS parametrar första gången kitet används. Kontrollera parametrarnas noggrannhet efter årlig service eller om instrumentet behövt lagas med mera. Det är viktigt med tillräcklig separation mellan bärnstenssyra och MMA.

OBS! De är viktigt att D₃-MMA och MMA har samma MS-respons för att direkt kunna använda kalibrerkuvan för D₃-MMA vid kvantifiering av MMA. Om det inte är möjligt att erhålla samma respons för de båda analyterna får man kompensera genom att använda kvoten av responsfaktorerna vid beräkningen.

16. PROV – LAGRING OCH TRANSPORTFÖRHÅLLANDEN

Använd serumrör med gel och koagulationsaktivator. Vänd på röret omedelbart efter provtagning 6 - 10 gånger. Håll röret upprätt i 30 minuter efter provtagning.

Hållbarhet under lagring och transport från provtagning till ankomst till analyslaboratoriet.

I rumstemperatur högst 4 timmar, efter centrifugering rumstemperatur i högst 24 timmar, kyld, max 3 dagar.

Låt prover och lösningen nå rumstemperatur före användning.

17. PREPARERING AV EXTRAKTIONSÖSNING MED INTERNSTANDARD

Centrifugera röret med ¹³C₄D₃-MMA (IS) (2000 RCF, 2 min), öppna röret och överför lösningens hela innehåll (200 µL) till EXT flaskan. Den slutliga koncentrationen av ¹³C₄D₃-MMA i extraktionslösningen är 0.25 µM.

18. PROVUPPARBETNING

Behandla patient- och kalibreringsprover på samma sätt.

1. Sätt till 50 µL serum/plasma till 250 µL extraktionslösning innehållande internstandard
2. Blanda väl (vortex)
3. Centrifugera vid 16400g, i 10 min rumstemperatur
4. Överför supernatanten till nytt rör, injektionsvialer/mikrotiterplatta.
5. Indunsta till torrhet
6. Sätt till 100 µL rekonstitueringslösning
7. Injicera 5 µL.

Om MS-toppen är för hög, späd provet med en tillräcklig volym REC.

19. KALIBRERINGSKURVA

Kalibreringskurvan är redo att användas.

20. BESTÄMNING AV KONCENTRATIONEN AV MMA I PROVER

Eftersom inget plasma/serum är fritt från MMA används D₃-MMA som en surrogatmolekyl.

Responsfaktorn för MMA och D₃-MMA måste vara identiska, annars måste en responsfaktorkvot användas vid kvantifieringen.

Kvoten mellan analytaren (D₃-MMA) och internstandardaren (¹³C₄D₃-MMA) plottas emot koncentrationen av D₃-MMA för att bilda en linje. Första ordningens linjära ekvation viktad emot 1/x används sedan för att beräkna MMA koncentrationen i proverna.

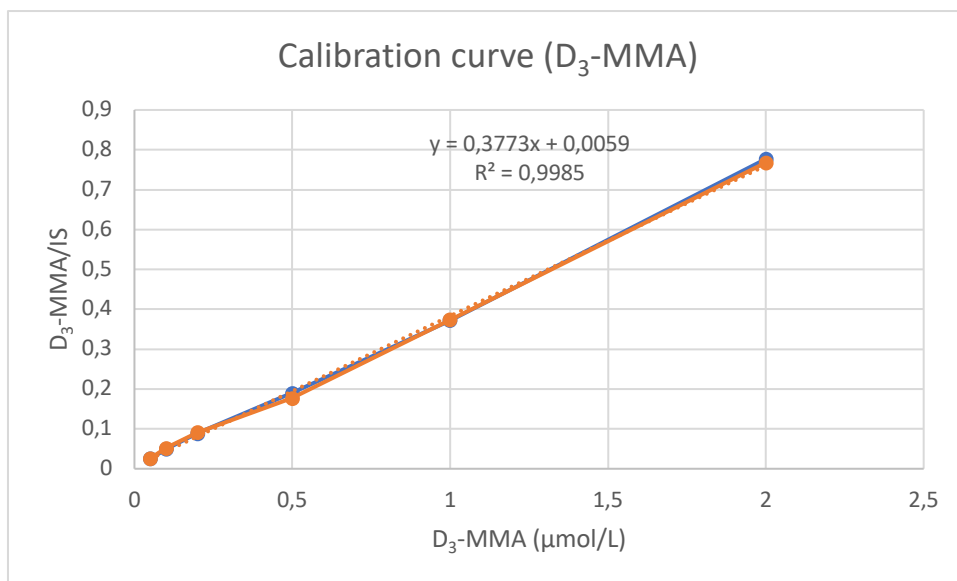


Figure 1: Högsta kalibratornivå (2 µM)

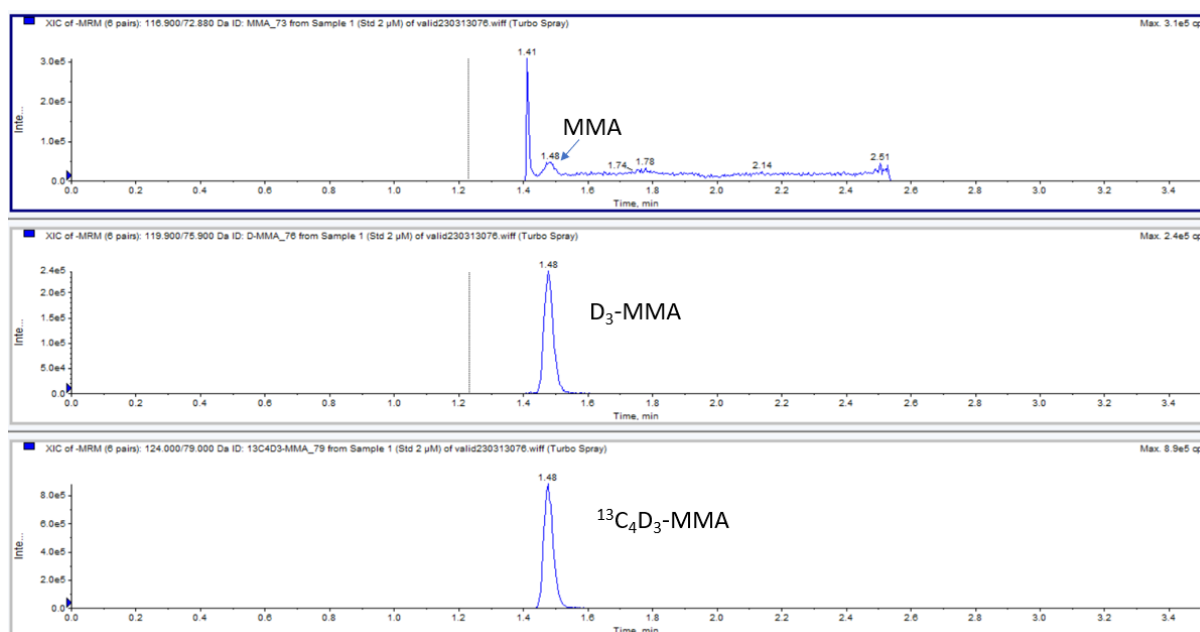


Figure 2: Eftersom topparean för bärnstenssyra i blodprover är högre än för MMA är det svårt att integrera toppen på ett bra sätt. Låt flödet gå till slask strax innan MMA eluerar då kommer största delen av bärnstenssyratoppen inte att påverka integreringen av MMA-toppen.

21. KVALITETSKONTROLL

Kontrollproven bör tas med i varje ny provomgång för att försäkra sig om att analysen visar rätt koncentration. MS responser (topparean) för internstandarderna ska i stort sett vara lika stor i alla prover i en analysomgång. Större skillnader kan vara ett bevis på att de tillsatta volymerna avviker i vissa prover. Systematisk minskning av topparean för internstandarderna i en eller flera analysomgångar kan bero på kontaminerad LC-kolonn eller jonkälla. Den märkta internstandarderna ($^{13}\text{C}_4\text{D}_3\text{-MMA}$) kompenserar för jonsuppression, volymkillnader efter indunstningen och injektionsvolym.

Carry-over

”Carry over” för MMA efter två blankprov ligger under 1 % för både MMA och $\text{D}_3\text{-MMA}$.

”Carry over” beror främst på att små mängder av substanserna fastnar på kolonnen och som över tid ackumuleras.

Det är därför viktigt att injicera s.k. blankar innehållande ex. mobilfas A mellan prover och speciellt viktigt efter höga halter kalibrerprover.

Det kan också ibland vara nödvändigt att skölja igenom kolonnen en lite längre tid med mobilfas B.

22. PRESTANDA

LOQ (gräns för kvantifiering)

0,025 μM

Mätområde

0,025 – 2.0 μM

Prov som innehåller mer än 2.0 μM ska spädas och analyseras igen.

Reproducerbarhet $\text{D}_3\text{-MMA}$

$\text{D}_3\text{-MMA}$ ($\mu\text{mol/L}$)	% std dev (%) intra assay (n=4)
0.075	8.9
0.75	5.8
1.5	4.0

23. REFERENSNIVÅER FÖR MMA

<0.28 $\mu\text{mol/L}$ för personer under 50 år

<0.36 $\mu\text{mol/L}$ för personer som är över 50 år

24. REFERENSER

- Green, R. et al. Vitamin B12 deficiency. Nature Review. 2017, 3, 1-19
- 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.
- Wilsdon, T. et al. A landscape assessment of newborn screening (NBS) in Europe. CRA Insights: Life Science. 2021, 1-12.
- Hannibal, L. et al. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. Frontiers in Molecular Sciences. 2016, 3, 1- 16.
- 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. APPENDIX 1

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