



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.	KITINNEHÅLL	4
8.	FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN FÖR KITINNEHÅLL	4
9.	MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED I KITET	4
10.	PREPARERING AV MOBILFASERNA	4
11.	LC-MS/MS METOD	4
12.	TRANSITIONER	5
13.	KROMATOGRAFI	5
14.	TVÄTTLÖSNING:	5
15.	UPPSTARTSPROCESS:	5
16.	PROV - LAGRING OCH TRANSPORT FÖRHÅLLANDEN	6
17.	PREPARERING AV EXTRAKTIONSLÖSNING	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, ersättningskit

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 fosfatidyletanol, (PEth) 16:0/18:1 i blod.

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

Metoden är avsedd för användning av professionell personal på laboratorier.

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

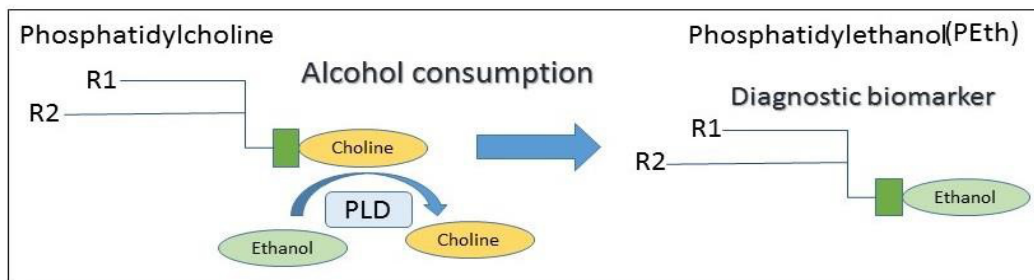
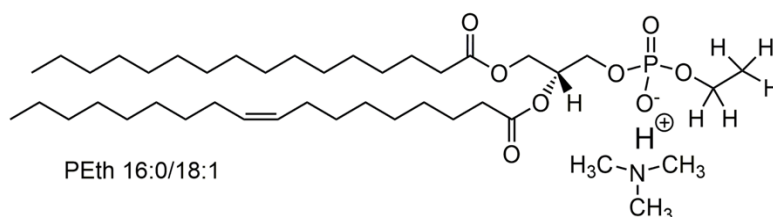


Bild 1. Principen för in vivo-generering av PEth beror på att fosfatidylkolin i närvaro etanol och fosfolipas D omvandlas till fosfatidyletanol.



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 användas 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 vid tillfällen när 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 fällningslösning innehållande internstandard (deutererad PEth). Efter grundlig blandning centrifugeras röret och en del av supernatanten injiceras i LC-MS/MS-systemet. Analyterna separeras på en LC-kolonn (art.nr 52015) med användning av en binär gradient. Flödet från kolonnen detekteras med ett MS/MS instrument med hjälp av negativ jonisering för att detektera PEth och D₅-PEth. Kvoten mellan topparean av PEth och D₅-PEth används för att kvantifiera 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 lösningar 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 blodprover. När analysen är avslutad, se till att kassera rester i enlighet med laboratoriets föreskrifter.

7. KITINNEHÅLL

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

Art. no. 50–2002, 200 bestämningar, ersättningskit

Märkning	Komponent	Kvantitet
CAL	Kalibrator i blod* 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 och 1 µM	7 x 0.2 ml
IS	D ₅ -PEth 16:0/18:1, 4.5 nmol	0.5 ml
EXT	Extraktionslösning	44.5 ml
TUN	"Tuning"-lösning	0.5 ml
COL	LC-kolonn	1 st.

*Koncentrationerna är riktvärden, certifikat med exakta värden följer med varje kit

8. FÖRVARINGSFÖRHÅLLANDEN FÖR KITINNEHÅLL

Lösningarna ska förvaras vid +2-8°C.

Långtidsförvaring: Kalibrator och intern standard ska förvaras vid -20°C

Korttidsförvaring: I rumstemperatur maximalt 8 timmar och i kyl för högst 2 dagar

Stabilitet vid användning har beskrivits av Isaksson et al. (11)

9. MATERIAL SOM BEHÖVS MEN INTE FÖLJER MED I KITET

1. LC-MS/MS utrustning
2. Mobil fas A
3. Mobil fas B
4. Vortex-blandare
5. Centrifug
6. Pipetter
7. Vialer
8. Appendix 1 listar produkter som finns tillgängliga för PEth metoden

10. PREPARERING 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. LC-MS/MS METOD

Sciex API5500 (exempel på inställningar)

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. TRANSITIONER

Analyt	Transition
PEth 16:0/18:1	701.5 > 281.2
PEth-d5 16:0/18:1	706.5 > 281.2

Fragment 281 används för att kvantifiering av PEth

13. KROMATOGRAFI

Flödes hastighet: 0.4 mL/min

Analys tid: 3.5 min

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

Om mottrycket är högt för LC-systemet, så är det rekommenderat att använda en kolonnvärmare med temperaturen 40 – 50°C

14. TVÄTTLÖSNING:

PEth är mycket fet och fastnar lätt i autosamplern. autosamplern bör därför tvättas regelbundet (mellan varje injektion) En rekommendation är att använda två tvättlösningar en stark och en svagare.

Stark tvättlösning: metanol/isopropanol, 4:1

Svag tvättlösning: 70% B- fas och 30% A-fas.

15. UPPSTARTSPROCESS:

Använd den medföljande "tuning"lösningen för att optimera de exakta MRM transitionerna och de andra parametrarna för PEth och D₅-PEth när kitet används för första gången.

PEth joniseras och fragmenteras lätt beroende på parametrar och instrument, detta kan resultera i för hög MS respons för elektronmultiplikatorn. Om för hög MS-respons späd provet/proven eller injicera en lägre volym.

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

16. PROV - LAGRING OCH TRANSPORT FÖRHÅLLANDEN

Analys utförs i blod: Använd endast EDTA-rör. NOTERA! Centrifugera inte! Blanda provet i en blodvagga 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 -200C.

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

Låt prover och reagens nå rumstemperatur före användning

17. PREPARERING AV EXTRAKTIONSLÖSNING

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

18. PROVPREPARATION

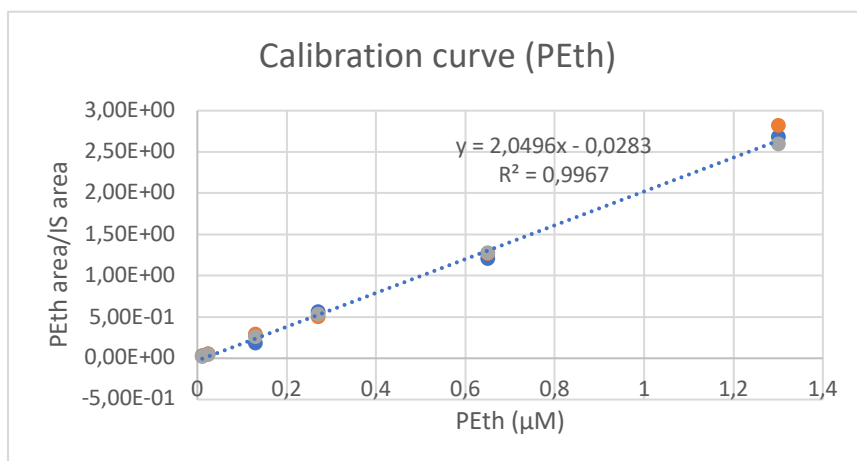
1. Till 20 µL blod sätt till 150 µL extraktionslösning
2. Blanda/skaka ordentligt
3. Centrifugera rören vid 16400 RCF i 10 min vid 10 °C (om kylcentrifug är tillgänglig)
4. Överför 120 µL av supernatanten till injektionsvialer
5. Injicera 5 µL

19. KALIBRATORKURVAN

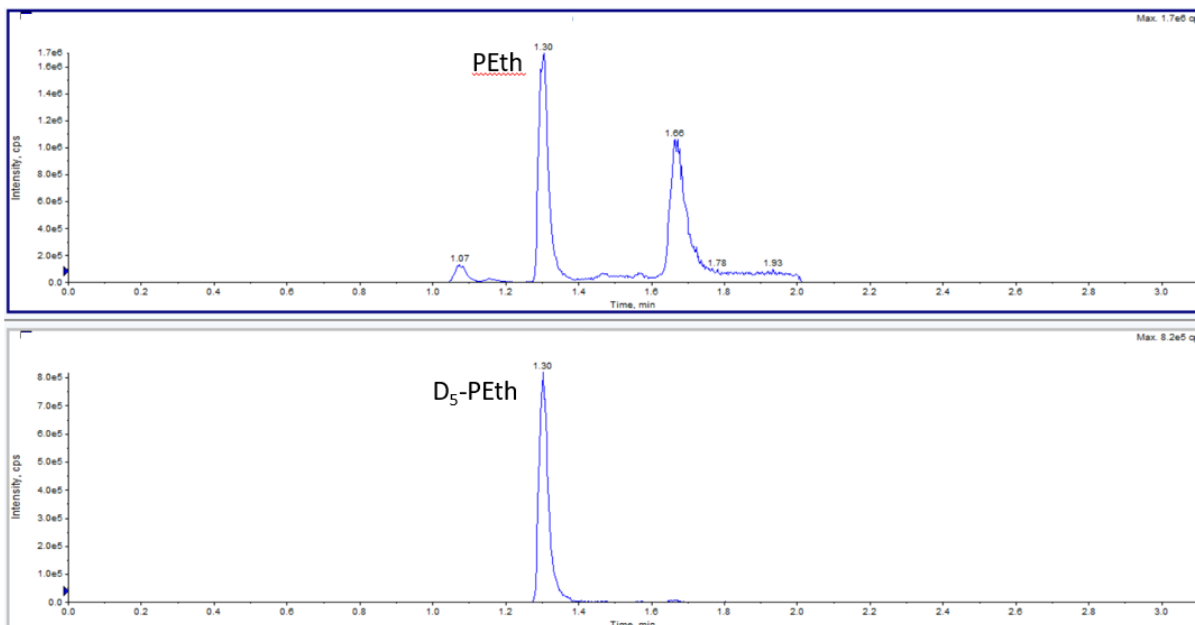
Kalibratorkurvan i blod är färdig att användas

20. BESTÄMNING AV PETH KONCENTRATIONER

För varje kalibratorkoncentration beräknas en kvot av topparan för analyten (PEth) genom topparean för internstandard (D₅-PEth). Dessa kvoter plottas emot kalibratorkoncentrationerna för få fram kalibratorkurvans ekvation, som används för att beräkna PEth koncentrationen i blodproverna. Första ordningens linjära regression viktad mot 1/X är att föredra.



Kalibratorkurva baserat på 701,5 -> 281,2



Kalibratorprov, 0.5 μM

21. KVALITETSKONTROLL

Kontrollprover 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 stora 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 och injektionsvolym.

Kontrollprover kan beställas från redhot diagnostics se bilaga 1.

22. PRESTANDA

Prestandan kan skilja sig mellan olika instrument

Mätområde

0.02 – 1.0 μM

Lägsta kvantifieringsnivå

0.02 μM (S/N 13)

Reproducerbarhet

PEth [$\mu\text{mol/L}$]	Intra Assay CV (%)
0.032	7.7 (n=6)
0.27	10 (n=10)
0.82	6.1 (n=6)

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
11. Isaksson A, Walther L, Hansson T, Andersson A, Stenton J and Blomgren B. High-Throughput LC-MS/MS Method for Determination of the Alcohol Use Biomarker Phosphatidylethanol in Clinical Samples by Use of a Simple Automated Extraction Procedure-Preanalytical and Analytical Conditions. *JALM* 2018, 2(6): 880-892

25. BILAGA 1

50-1011	PEth kalibratorkurva i blod	Färdigt i blod 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 µM, 0.2 mL Koncentrationerna är riktvärden, certifikat med exakta värden finns med i varje kit
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 prov high PEth	5x 0,5 mL
51-1009	QC prov low PEth	5x 0,5 mL
51-1017	QC prov medium PEth	5x 0,5 mL
50-2003	PEth LC-MS/MS kit 500 analyser	ink LC-kolonn
50-2004	PEth LC-MS/MS kit - 500 analyser	Ersättningskit
50-2005	PEth LC-MS/MS kit - 1 000 analyser	ink LC-kolonn
50-2006	PEth LC-MS/MS kit 1 000 analyser	Ersättningskit
Produkter för blodprovstagning		
10-5001	PEth - rhelise	1 paket provtagningskit
10-5010	PEth - rhelise	10 paket provtagningskit
10-5050	PEth - rhelise	50 paket provtagningskit