



Применение методов масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) в современной клинической лаборатории – обзор приложений, преимущества использования, современные подходы и возможности автоматизации.

Александр Кирилук PhD

Москва, ул Краснопролетарская, 7. т. 499-973-92-80

IVD-MKT-11-0769-A

AB SCIEX – КТО МЫ



Группа компаний Danaher



AB SCIEX входит в группу компаний Danaher
Danaher является одним из глобальных лидеров в отрасли технологий



Hach/Lange и Trojan UV – компании Danaher, обеспечивающие качество питьевой воды



Gendex - компания Danaher, занимающаяся здоровьем и внешним видом пациентов стоматологических клиник

Глобальные технологические бренды

Медицинские технологии
Профессиональные инструменты
Промышленные разработки
Комплектующие и средства поддержки

Тандемная масс-спектрометрия для клинической диагностики

- Большой потенциал в повышении точности результатов и скорости выполнения анализов
- Снижение издержек в рутинной диагностике *in vitro*

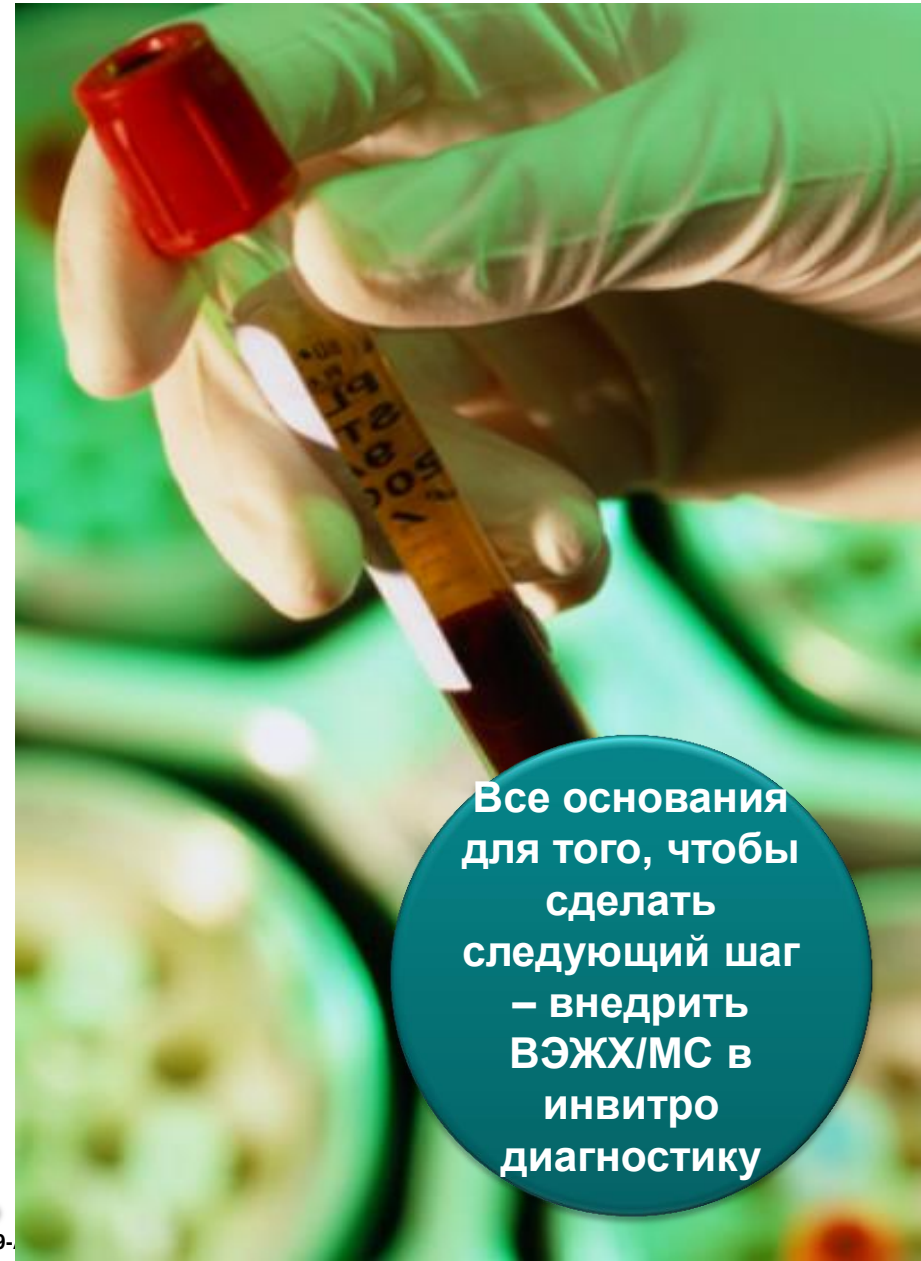
AB SCIEX представил первый масс-спектрометр для диагностики *In Vitro* в феврале 2013



Проверенный
аналитический
метод,
адаптированный
для применения
специалистами
КДЛ

Сильные позиции в клинических исследованиях

- Пять лет назад специалисты в клинических лабораториях едва ли знали о решениях AB SCIEX
- Сегодня масс-спектрометры AB SCIEX успешно применяются в сотнях клинических лабораториях во всем мире
- Основные применения: витамин D, стероиды, терапевтический лекарственный мониторинг, токсикологические исследования



Все основания
для того, чтобы
сделать
следующий шаг
– внедрить
ВЭЖХ/МС в
инвитро
диагностику

Скорости анализа, селективность и чувствительность - результаты, которым можно доверять



AB SCIEX API 3200MD™ QTRAP® 3200MD

Источник Turbo V™

с зондами
TurboIonSpray® и
APCI



Analyst® MD SW



Cliquant® MD SW



Серия **AB SCIEX 3200MD** устанавливает новый стандарт **надежного рутинного количественного анализа** множества аналитов в клинической лабораторной диагностике.

Также доступна с **уникальной функцией QTRAP®**, позволяющей **проводить одновременно количественный и качественный анализ** повышая таким образом **уровень достоверности**.

Понятный оператору интерфейс – **ПО Cliquant®** с поддержкой русского языка, а также специализированная **методическая и сервисная поддержка**, позволяет серии 3200MD стать **идеальной стартовой системой** для КДЛ



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
(РОСЗДРАВНАДЗОР)**

**РАЗРЕШЕНИЕ
НА ПРОВЕДЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЙ
МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ**

от 03.02.2015 № 140/2015

Медицинское изделие Система масс-спектрометрическая

(указывается наименование медицинского изделия (с указанием принадлежностей,

ВЭЖХ/МС/МС серии 3200MD для клинической лабораторной
диагностики, варианты исполнения: система ВЭЖХ/МС/МС API
3200MD, система ВЭЖХ/МС/МС QTRAP 3200MD

Новый бренд



Accuracy the First Time

Contact Us



TestsProductsAbout Mass SpecEventsIn the NewsContact Us



Handle every transplant with care
Learn about the new SCIEX Diagnostics kit >



Vitamin D Testing



Immunosuppressants Testing



Newborn Screening

Tests and Products

- [Vitamin D](#)
- [Immunosuppressants](#)
- [Newborn Screening](#)
- [Instruments](#)

Learn

- [About Mass Spec](#)
- [Basics](#)
- [8 Reasons to Use Mass Spec](#)

News and Events

- [Conferences](#) See us in a city near you
- [July 29, 2014: AB SCIEX announces the 4500MD series for in vitro diagnostic use AB SCIEX, a global leader in](#)

Quick Links

- [Contact Us](#)
- [Newsroom](#)

www.sciexdiagnostics.com

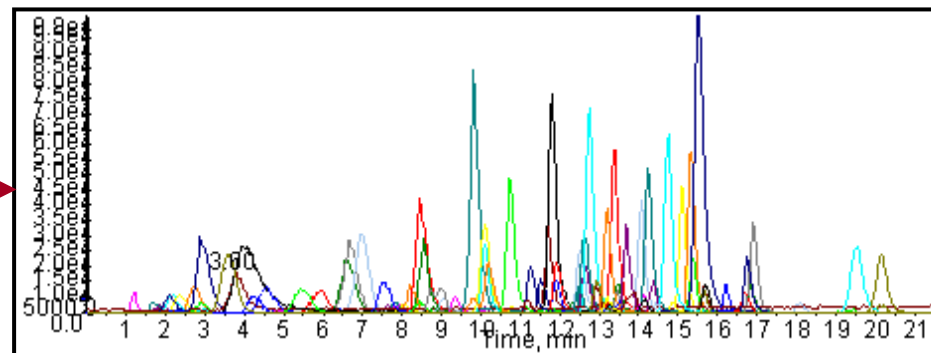


Три главных вопроса аналитической лаборатории :

- Сколько? (количественный анализ известных соединений)
- Что это? (анализ неизвестных соединений)
- Как эта информация может помочь?



LC/MS for
IVD



Основные проблемы анализа биологических образцов

- Сложные объекты (матрицы)
- Необходима высокая чувствительность – определение следовых количеств
- Необходима высокая точность определения
- Необходим одновременный количественный анализ и подтверждение
- Нужны надежные и стабильные методы
- Необходима простая и универсальная пробоподготовка
- Необходимость скрининга большого числа аналитов за один анализ

Сравнение ГХ/МС и ВЖХ/МС/МС

- *ГХ/МС* часто требует обширной, трудоемкой пробоподготовки в том числе дериватизацию.
- *ГХ/МС* протоколы подготовки проб часто являются специфическими для класса соединений, ограничивая скрининг аналитов по нескольким классам соединений
- *У ГХ/МС меньшая чувствительность и динамический диапазон*
- Трудоемкое обслуживание

Преимущества ВЖХ/МС/МС

- **Точность, специфичность, селективность.** Точный количественный анализ. Преимущество по сравнению с альтернативными технологиями, такими, как ИФА или ГХ/МС (подтверждение)
- **Надежность.** Анализ 1000-х аналитов в сложной матрице
- **Чувствительность.** На уровне нг/мл- пг/мл. Отличная воспроизводимость и динамический диапазон
- **Гибкость и Универсальность.** Позволяет легко добавлять аналиты в анализ. Нет перекрестной реактивности!
- **Стандартная Пробоподготовка.** Та же для разных классов соединений! Не требует сложной дериватизации
- **Возможен Прямой Ввод.**
- **Низкая цена анализа за образец** по сравнению с другими технологиями
- **Скорость (UPLC).** Ответы за минуты! Высокая пропускная способность
- **Простота в использовании.** Автоматизация/отчетность снижает рутинную трудоемкость

Тандемная масс-спектрометрия – замена иммунохимических методов?

Основные проблемы применения	Применение ИФА	Применение масс-спектрометрии
Проблемы специфичности	Хорошо описанные проблемы кросс-реакций и наложений.	Детекция методом селекции масс позволяет добиться более надежных и достоверных результатов
Низкие пределы количественного анализа	ИФА тесты достигли своих пределов количественного определения	Селективность масс-спектрометра позволяет снизить пределы обнаружения и количественного анализа
Высокие издержки	Обычно высокая стоимость, особенно в случае применения индивидуальных тестов	Низкие эксплуатационные расходы и мультиплексный анализ позволяет снизить издержки
Дефицит антител (сложности с созданием новых тест-систем плюс длинный цикл разработки)	Долгое время разработки новых тестов	Не требует антител для разработки новых тестов



Неспецифичная Кросс-реакция Иммунохроматографических Методов на Примере Тест- Полосок

МЕТАМФЕТАМИН

- Возможно обнаружение (d-Метамфетамин, п-гидроксиметилметамфетамин, l-метамфетамин, Мефетермин, 3,4-метилendioксиметамфетамин (МДМА))
- Кросс-реакция также на псевдоэфедрин, хлорохин, фенилпропаноламин, эфедрин, тирамин, ранитидин, фенфлюрамин.

Тетрагидроканнабиол (конопля или марихуана)

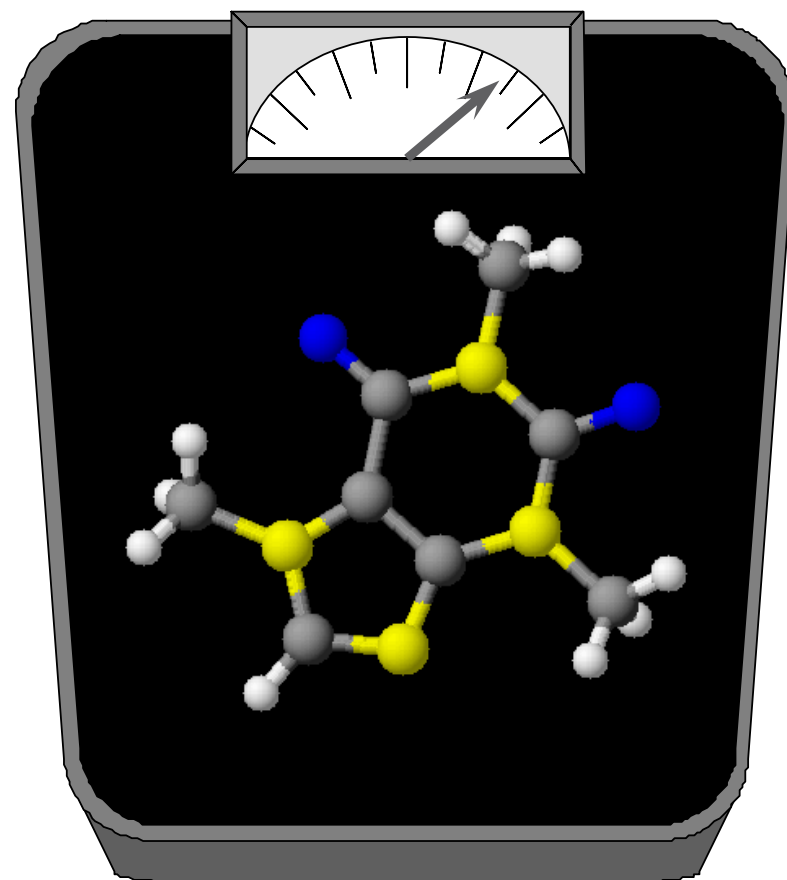
- кросс-реакция возникает на дибазол, кетопрофен, ибупрофен и напроксен.

Опиаты (морфин или его метаболиты)

- Определение: Кодеин, Морфин, Морфина глюкуронид, Кодеина глюкуронид
- Помимо: Гидрокодон, Прокаин, Тебаин, Леворфанол, Оксикодон, 6-моноацетилморфин, Норкодеин, Норморфин, Оксиморфон, Этилморфин, Гидроморфин

- Источники ионов

- Типы масс-анализаторов

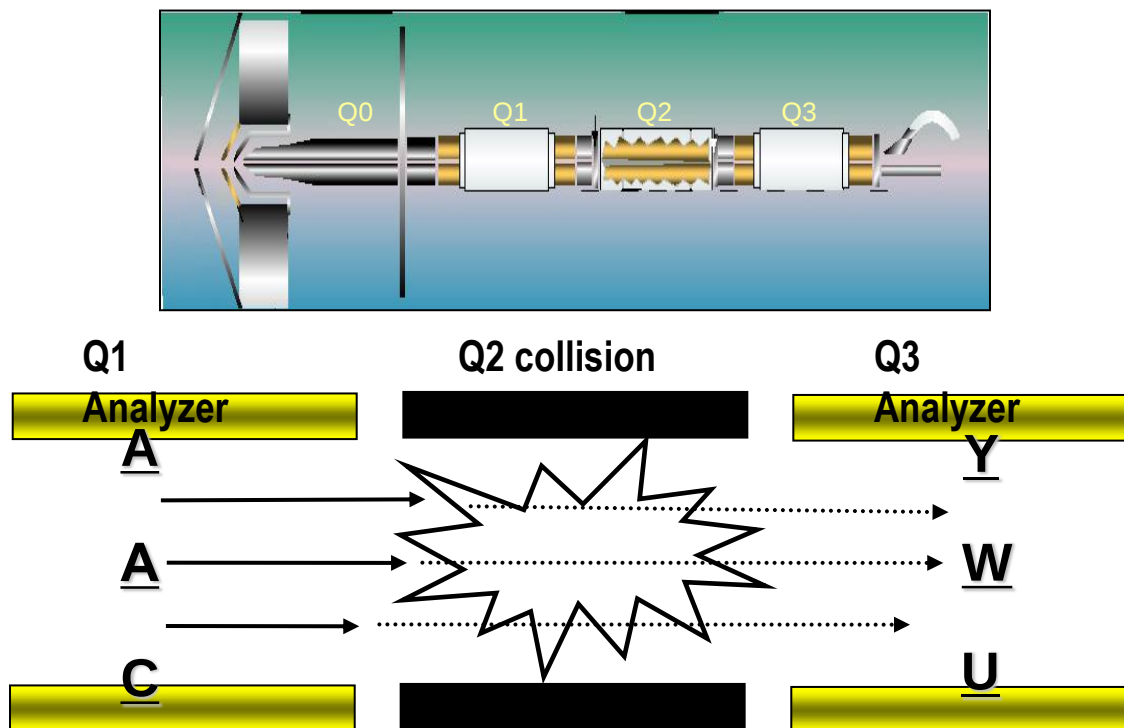


Основы Метода тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС-МС), с квадрупольным масс-спектрометром

Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Лучшая селективность – низкий предел обнаружения и количественного анализа

Одновременный Количественный анализ множества аналитов



A-Y : Количественный анализ

A-W : Подтверждение

C-U : Внутренний стандарт

Компактность



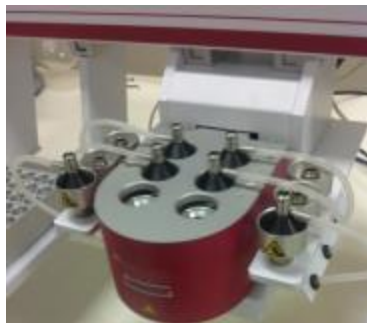


Роботизация и автоматизированные системы подготовки образцов

DPX-LC/MS/MS



Load



Clean

IVD-MKT-11-0769-A



Analyze

SCIEX
Diagnostics

Методы ВЖХ/МС/МС, применяемые в клинической лаборатории обеспечивают контроль за содержанием следовых количеств биологически-активных веществ, маркеров, гормонов, мониторинг лекарственных препаратов, токсинов в крови и других физиологических жидкостях и тканях, гарантируя высокий уровень надежности результатов



**Больше
анализов**

+



**За меньшее
время**

=



Экономичность

Клинические исследования с применением ВЭЖХ/МС/МС

Терапевтический мониторинг лекарств

Иммунодепрессанты

Обезболивающие препараты

Антиретровирусные препараты

Противосудорожные препараты

Нейролептики

Антираковые агенты
и многие другие

Исследования врожденных пороков метаболизма

Более 40 заболеваний

Обмен Жирных кислот

Оксидативные нарушения

Аминокислоты

Ацилкарнитины

Формы гемоглобинов
и многие другие

Биомаркеры

Стероиды

Витамин D и метаболиты

T3/T4

Гомоцистеин

Катехоламины

Оротовая кислота

Длинноцепочечные жирные кислоты

Желчная кислоты

Раковые маркеры
(Пептиды и белки)

Токсикологические исследования

Полный скрининг лекарств

Наркотики

Каннабиоиды

Опиаты

Амфетамины

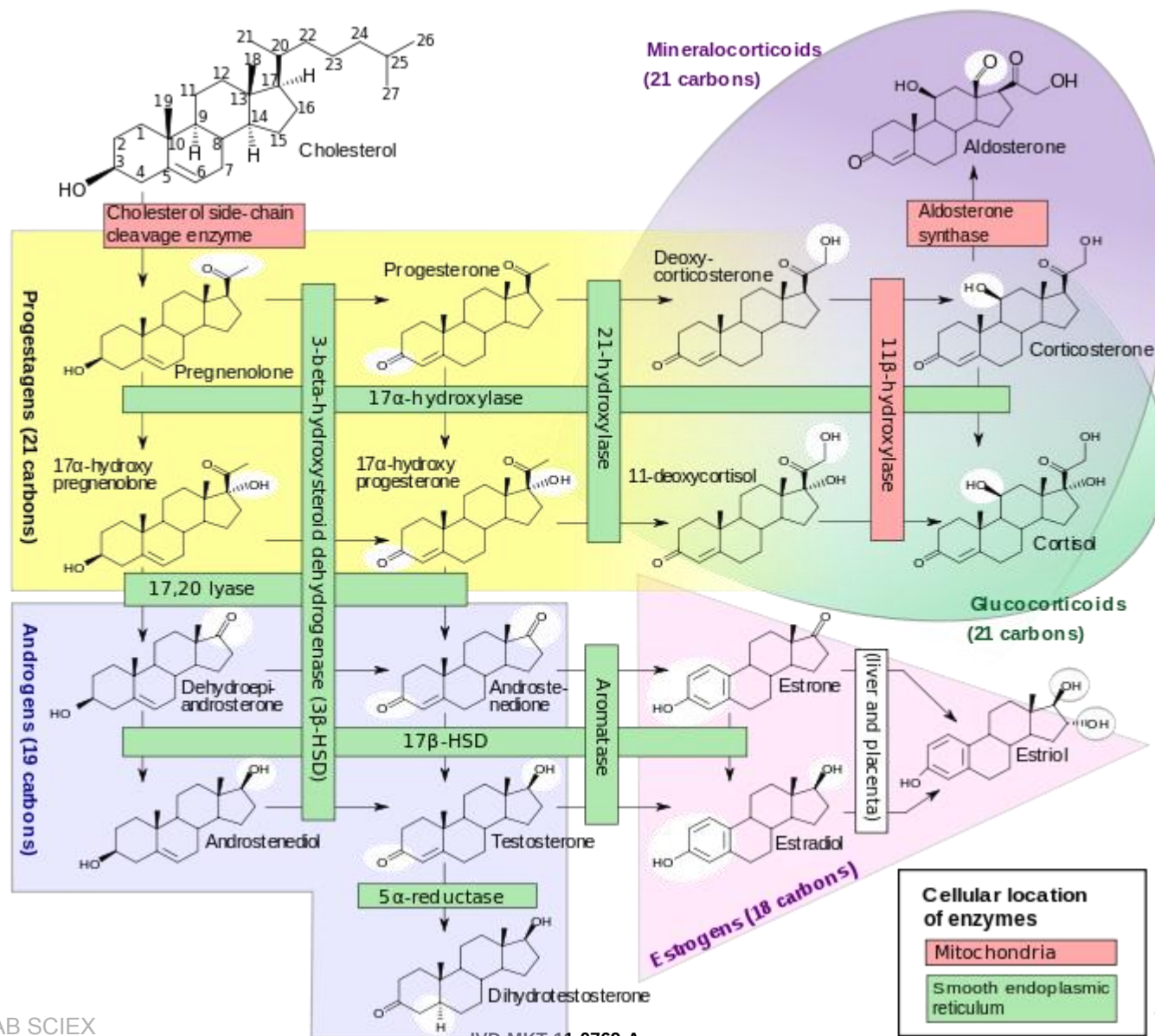
Бензодиазепины

Обезболивающие препараты

Барбитураты

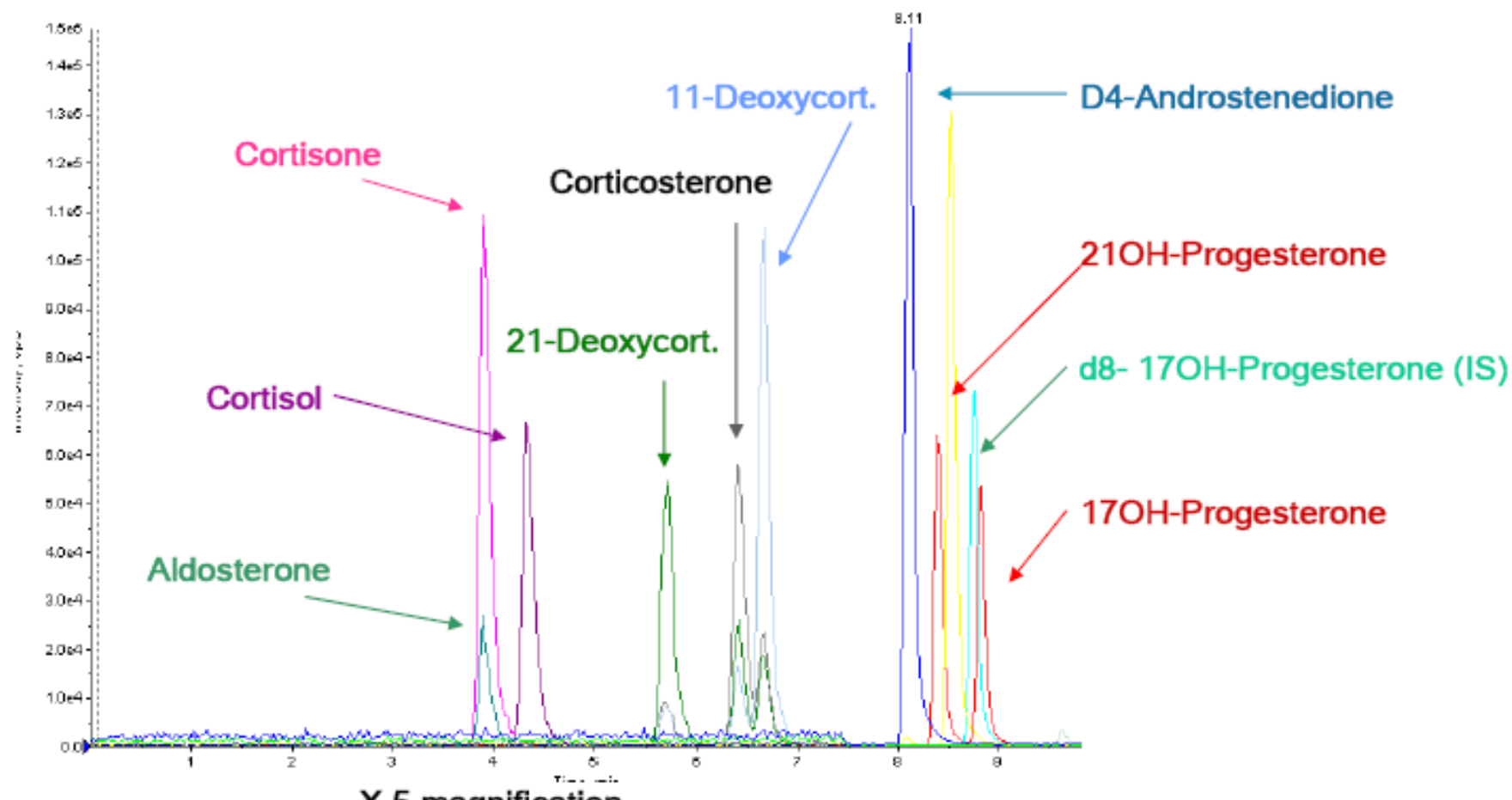
и многие другие

Стероиды

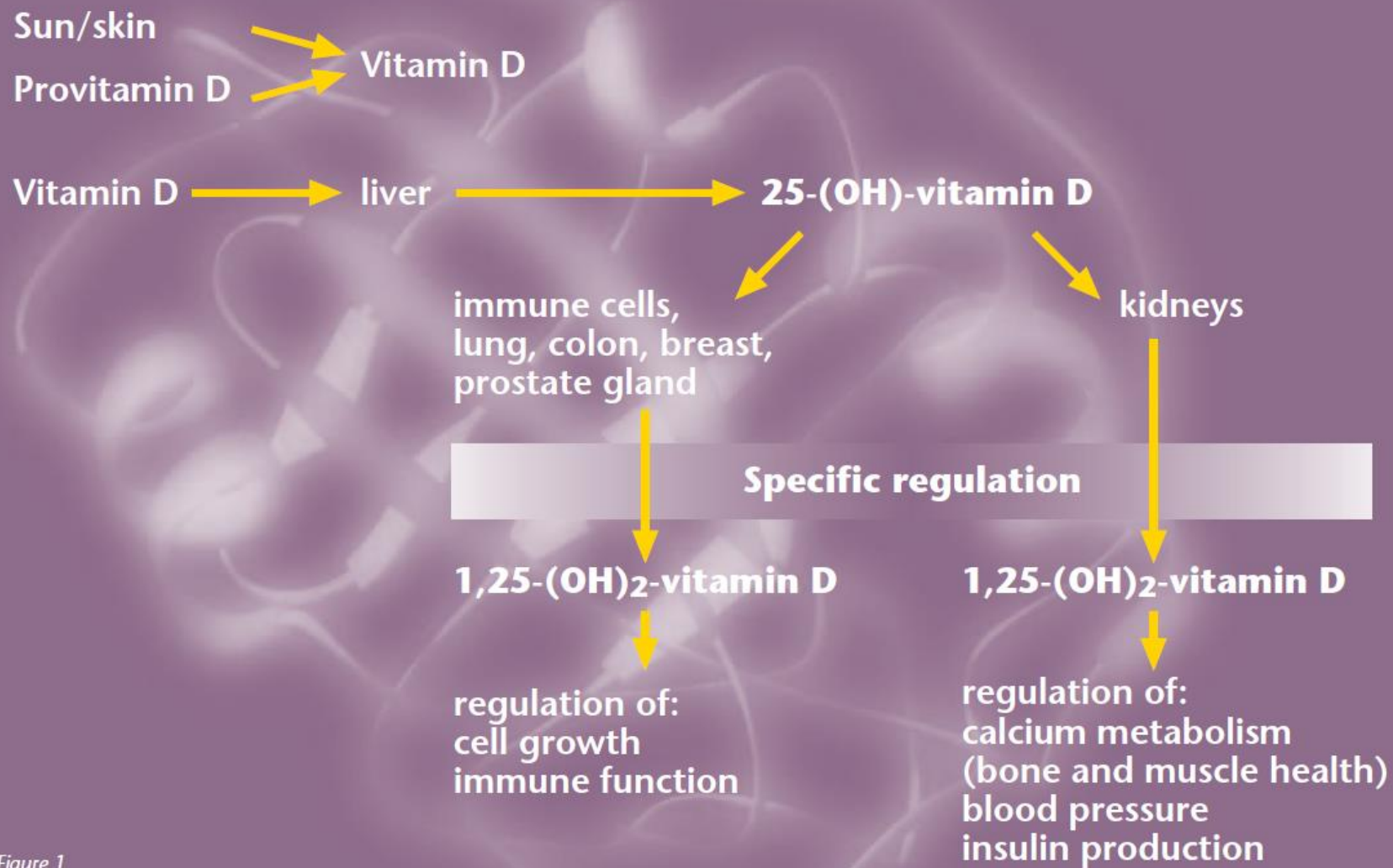


Стероидная панель

Steroids Mixture from Calibrator (33 nM ~ 10 ng/mL) by LC/MS/MS (ESI): 5 picomoles each injected.



Витамины D

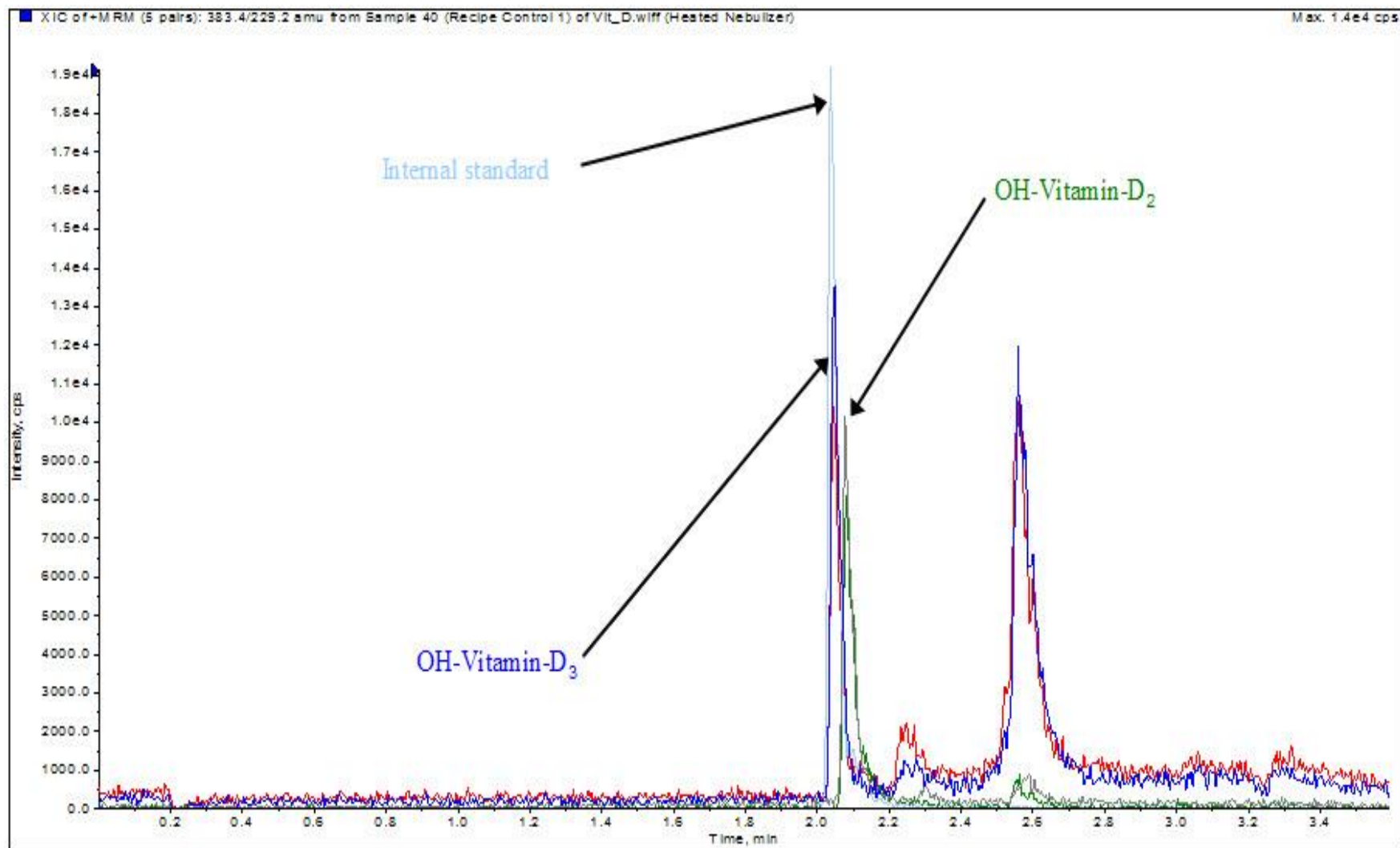


Анализ витамина D

- Дефицит витамина D связывают с различными заболеваниями такими, как рак, нарушения иммунной системы, болезни сердца, диабет и другими проблемами со здоровьем. За последние пару лет это привело к значительному росту количества исследований связанных с изучением витамина D.
- ВЭЖХ/МС/МС спектрометрия быстро приобрела статус референтного метода детектирования и количественного анализа витамина D в биологических образцах



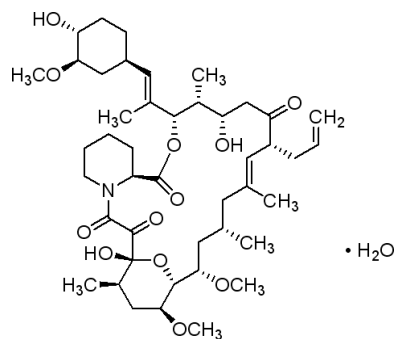
Пример хроматограммы образца ОН-витамина-D3 и ОН-витамина-D2 выполненных на системе 3200 QTRAP



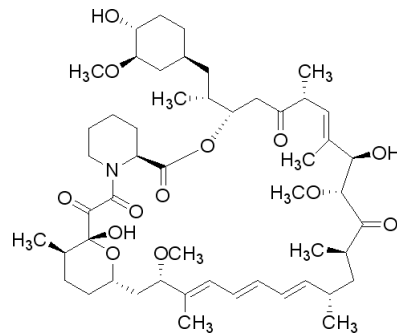


Мониторинг препаратов с узким терапевтическим диапазоном

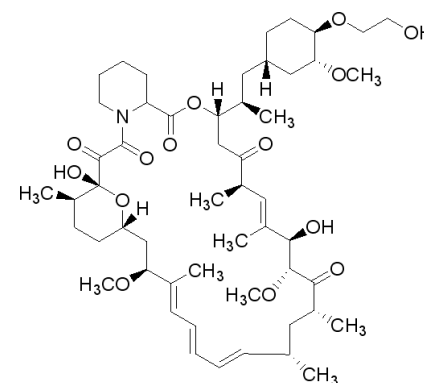
Иммунодепрессанты



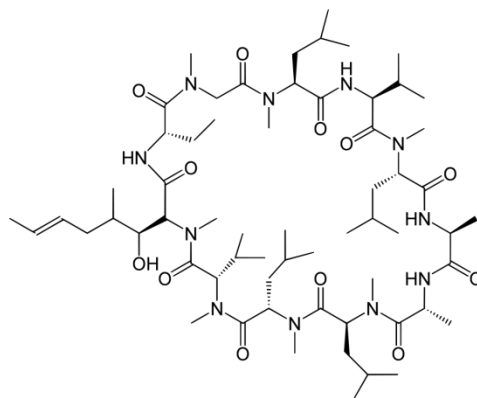
Tacrolimus
(aka FK-506)
MW 822.0



Sirolimus
(aka Rapamycin)
MW 914.2



Everolimus
MW 958.2

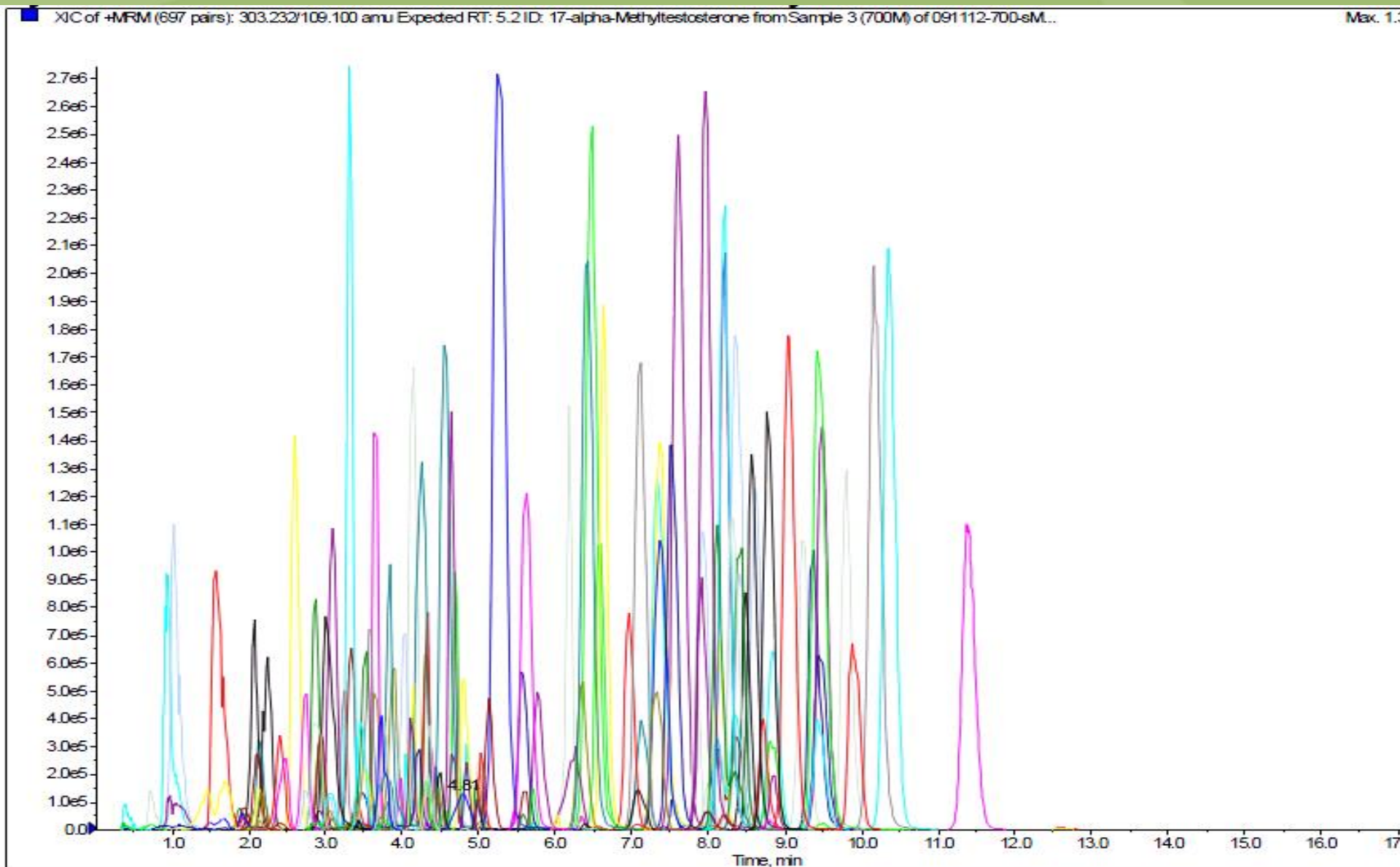


Cyclosporin A
MW 1202.6

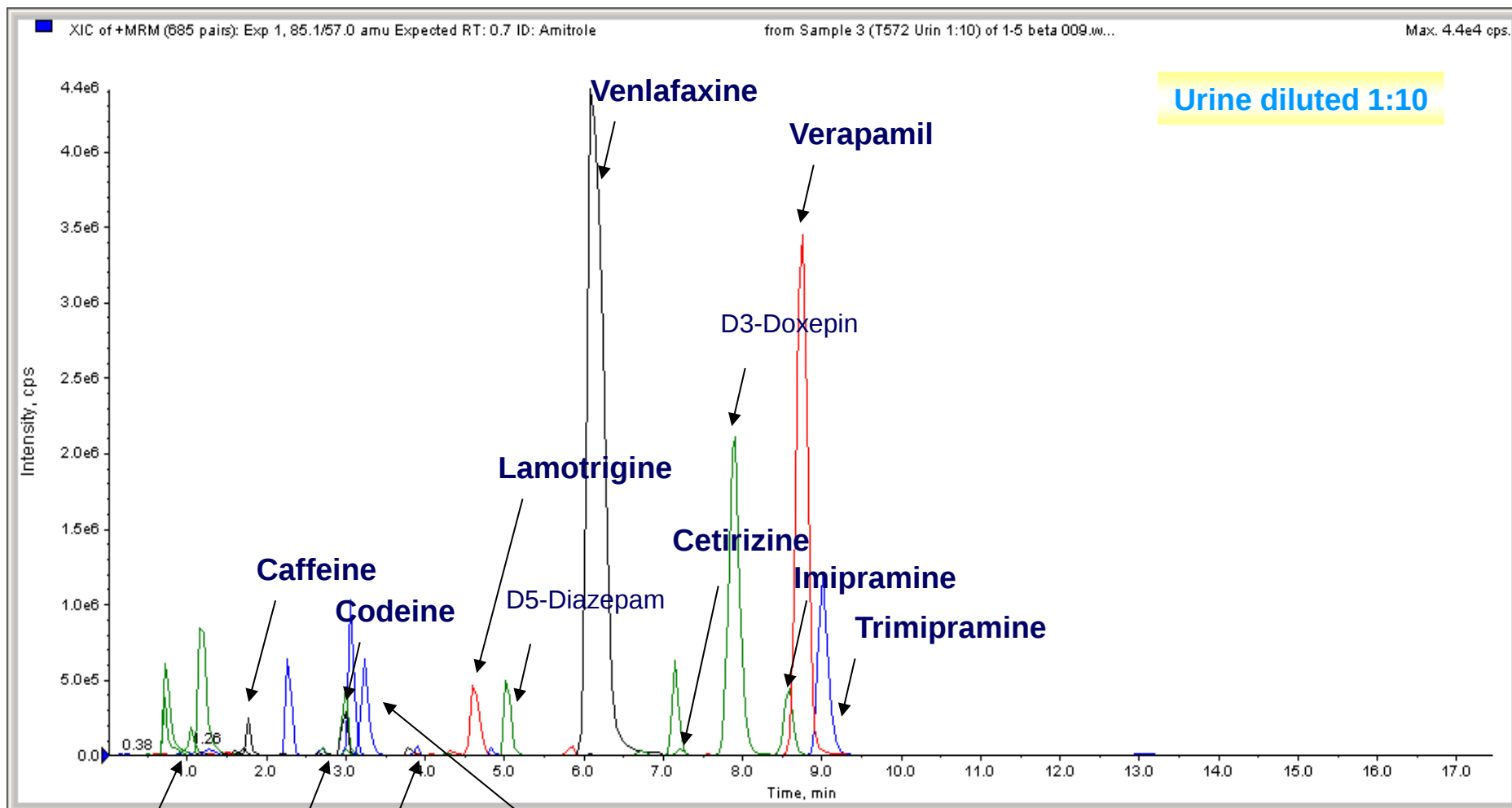


Скрининг

Анализ образца мочи на 697 лекарств

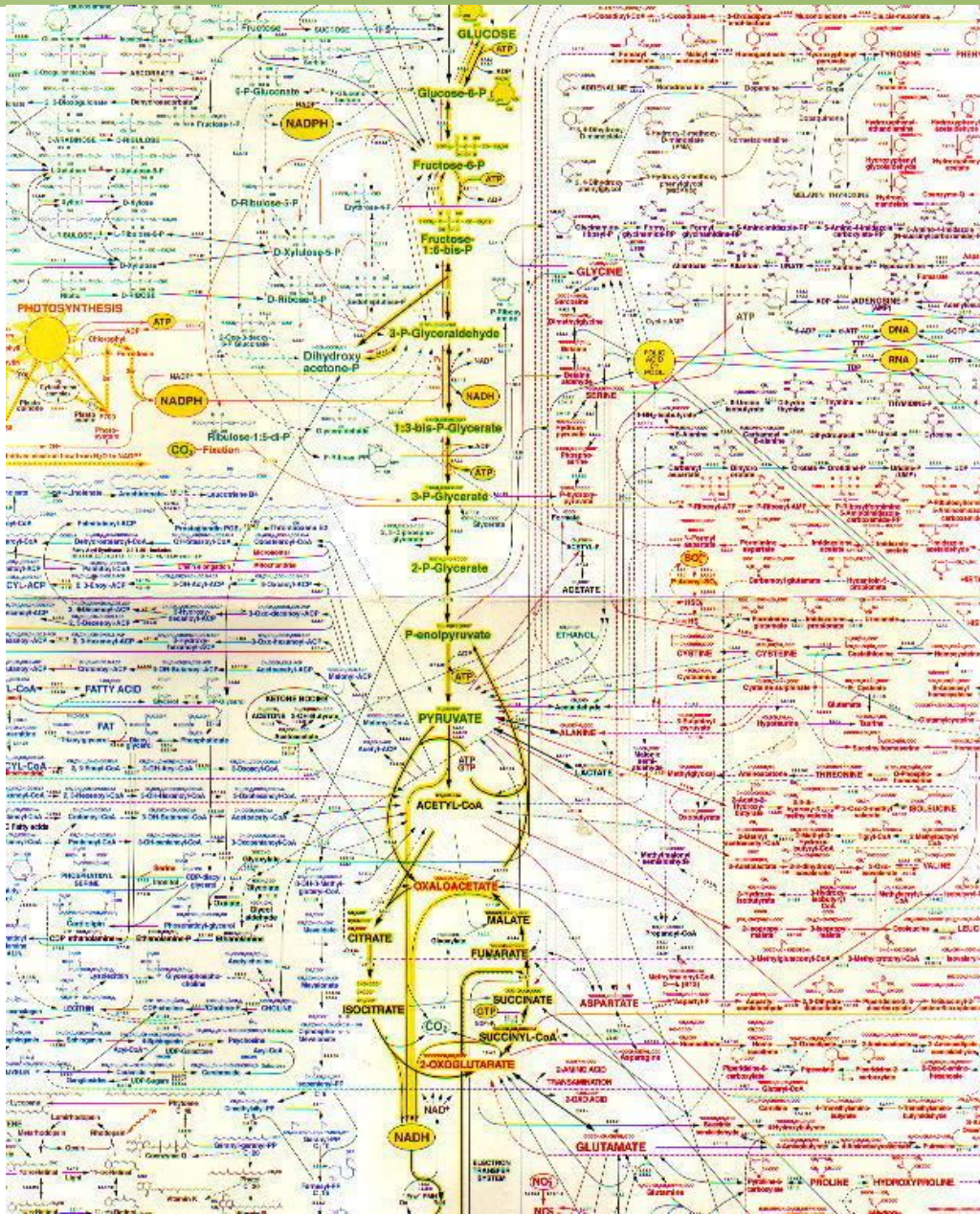


Пациент страдающий от хронической депрессии и эпилепсии. В анамнезе- множественные попытки самоубийства.





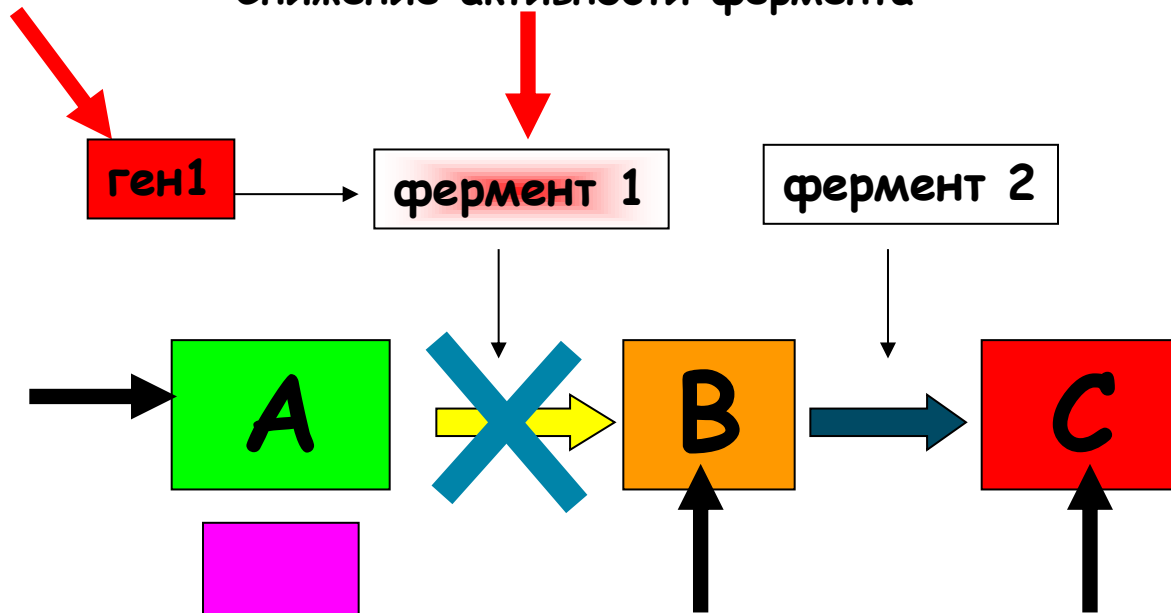
Наследственные болезни обмена веществ



Метаболизм –
совокупность
взаимосвязанных
биохимических
процессов в
организме.
Каждая
биохимическая
реакция в
организме
катализируется
ферментами

Мутации в гене

Снижение активности фермента



Снижение количества продуктов реакции

Увеличение содержания производных субстрата
в биологических жидкостях или тканях

Известно более 500 форм наследственных нарушений метаболизма. Классификация:

22 подкласса в зависимости от пораженного метаболического пути

Подклассы:	частота
Аминоацидопатии	31%
Органические ацидурии	27%
Дефекты цикла мочевины	21%
Дефекты дыхательной цепи митохондрий	12%
Гликогенозы	8%
Дефекты митохондриального β -окисления	8%
Пероксисомные заболевания	4%

Наследственные нарушения метаболизма – редкие заболевания.

Частота встречаемости

Заболевания

Частота

Аутосомно-рецессивный тип наследования

Фенилкетонурия	1:8 000
Болезнь Тея-Сакса	1:120 000
(среди евреев-ашкенази)	1:3 000
Болезнь Гоше	1:40 000
Болезнь Краббе	1:100 000

Х-сцепленный рецессивный тип наследования

Х-сцепленная адренолейкодистрофия	1:40 000
Мукополисахаридоз тип II	1:70 000

Как проявляются наследственные нарушения метаболизма. Диагностика

- В большинстве случаев заболевания сопровождаются поражением многих органов
- Могут проявляться в любом возрасте от младенческого до взрослого, в зависимости от метаболического дефекта
- Клинические симптомы, как правило, неспецифичны
- Многие заболевания чрезвычайно сходны по клиническим проявлениям
- Точная диагностика возможна только с помощью лабораторных методов

- НБО – обширный класс редких моногенных болезней, суммарная частота которых высока (не менее чем 1:5000 живых новорожденных). Многие из НБО поддаются лечению. Для некоторых возможно полная клиническая коррекция.
- При точно установленном диагнозе возможно проведение дородовой (пренатальной) диагностики в семье.



IVD-MKT-11-0769-A

Массовый скрининг новорожденных

- Во всех странах проводится массовое обследование новорожденных на некоторые из НБО (фенилкетонурия)
- В некоторых странах скрининг включает 30-40 форм НБО
- Современные технологии позволяют проводить скрининг на многие из НБО. Для их диагностики необходимо уникальные и дорогостоящие биохимические тесты, а частота их в популяции не велика, что не позволяет включать их в программу массового скрининга на НБО.

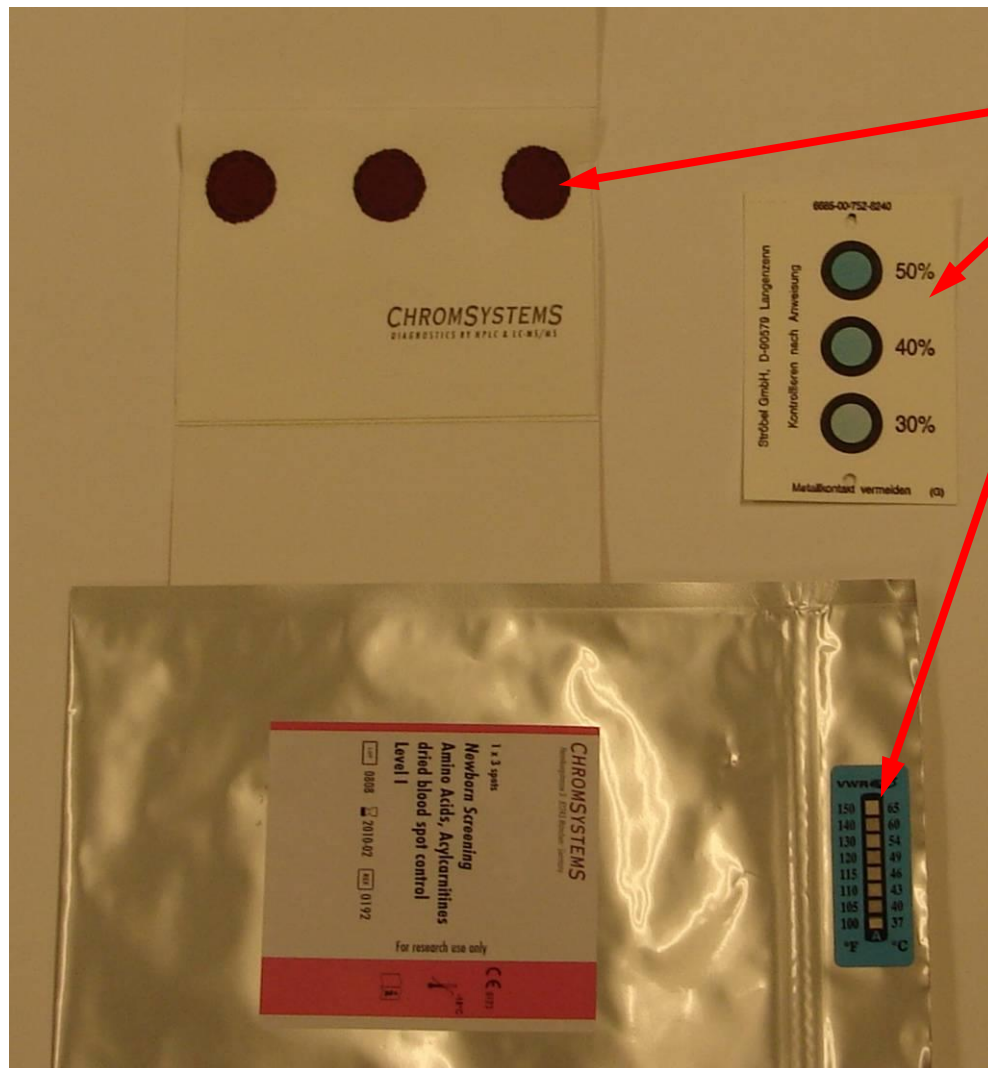
Анализ на аминокислоты и ацилкарнитины сухих пятен крови

Набор предназначен для количественного определения аминокислот и ацилкарнитинов с помощью системы [AB SCIEX 3200MD Series](#).

- Реагенты и стандарты
- Данные для диагностики около 40 заболеваний, связанных с наследственными нарушениями обмена веществ полученные в результате анализа сухого пятна крови
- Простая конфигурация оборудования – не требуется хроматографическое разделение

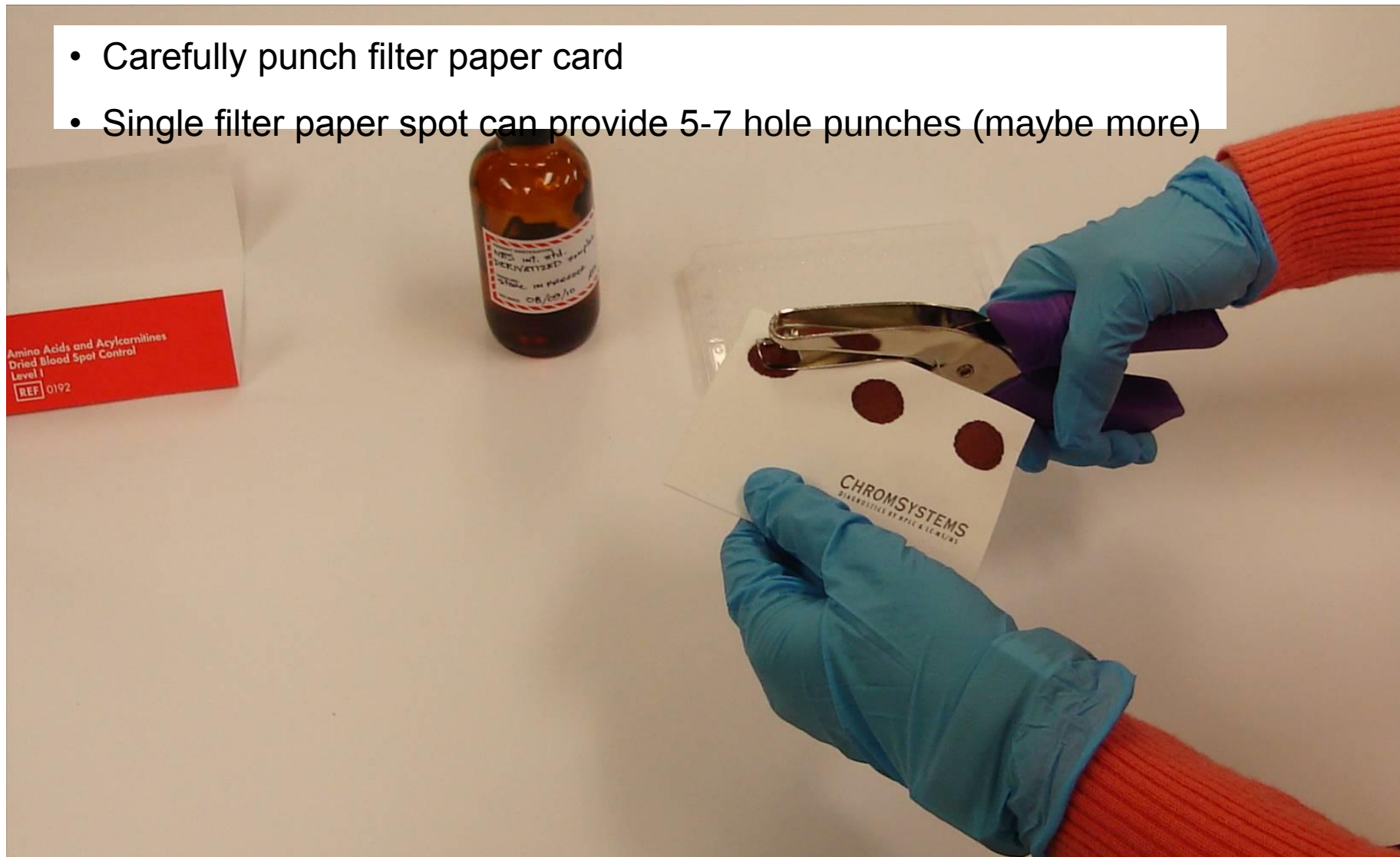




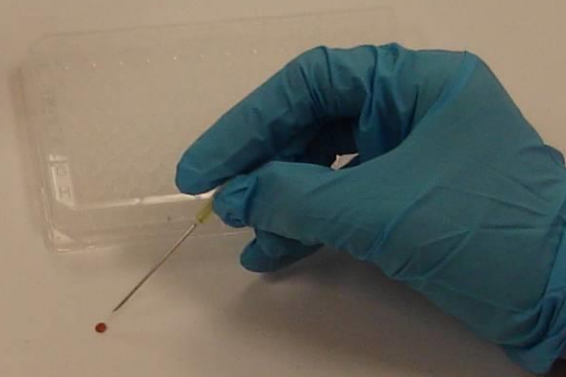


- 3 пятна
- Индикатор влажности
- Индикатор температуры

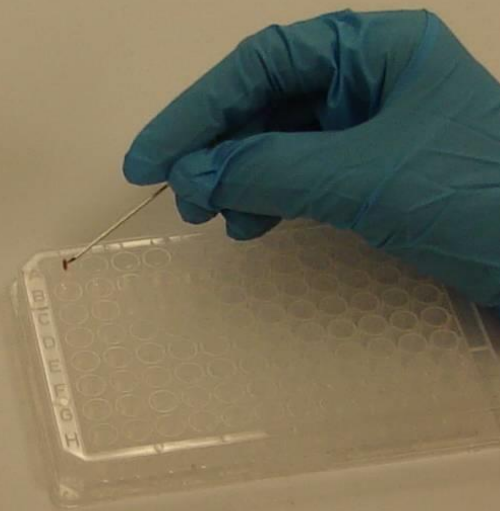
- Carefully punch filter paper card
- Single filter paper spot can provide 5-7 hole punches (maybe more)



- Carefully collect
filter paper spot



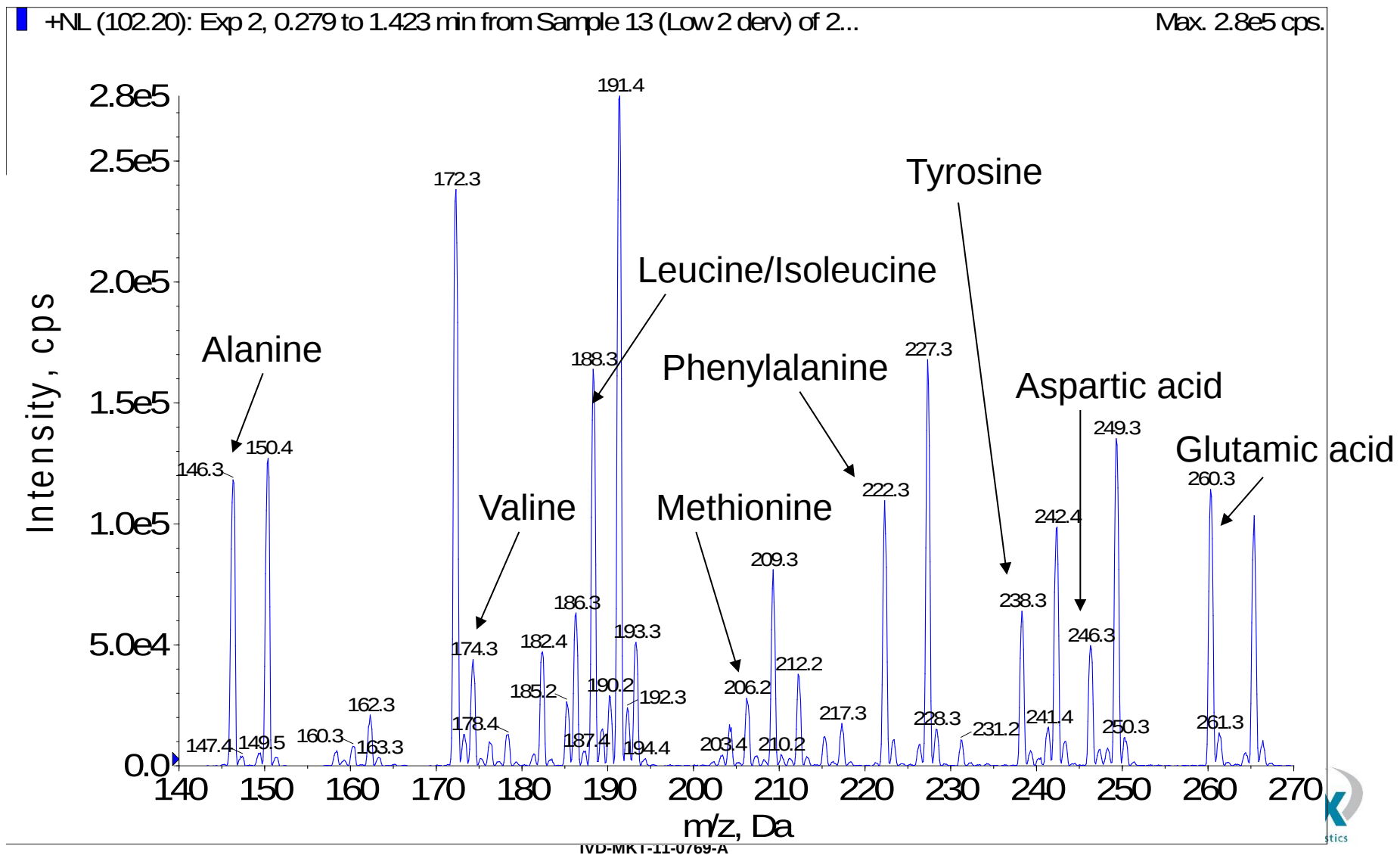
- Place filter paper
spots into well plates



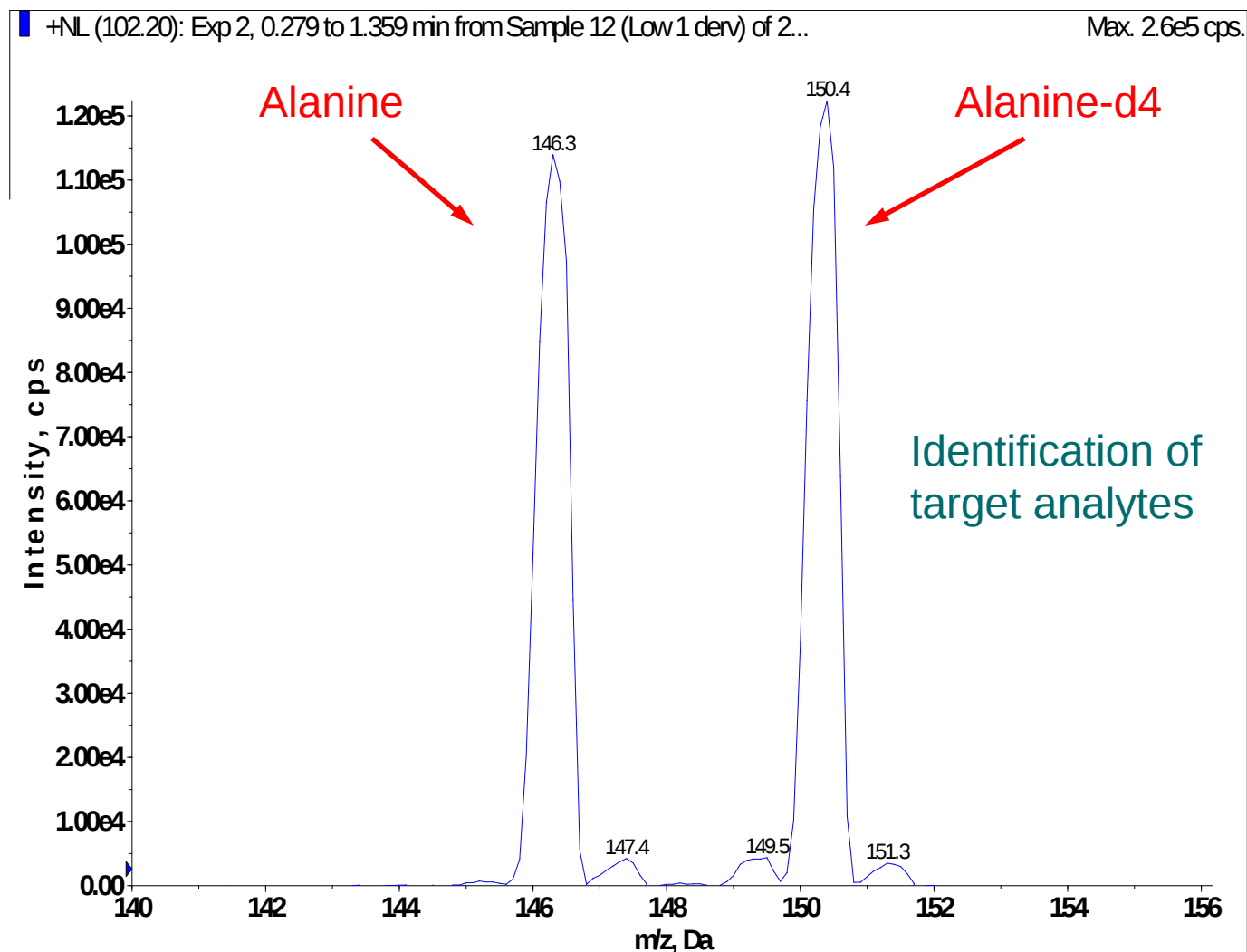
- Add 200 μ L of extraction
solution to each well



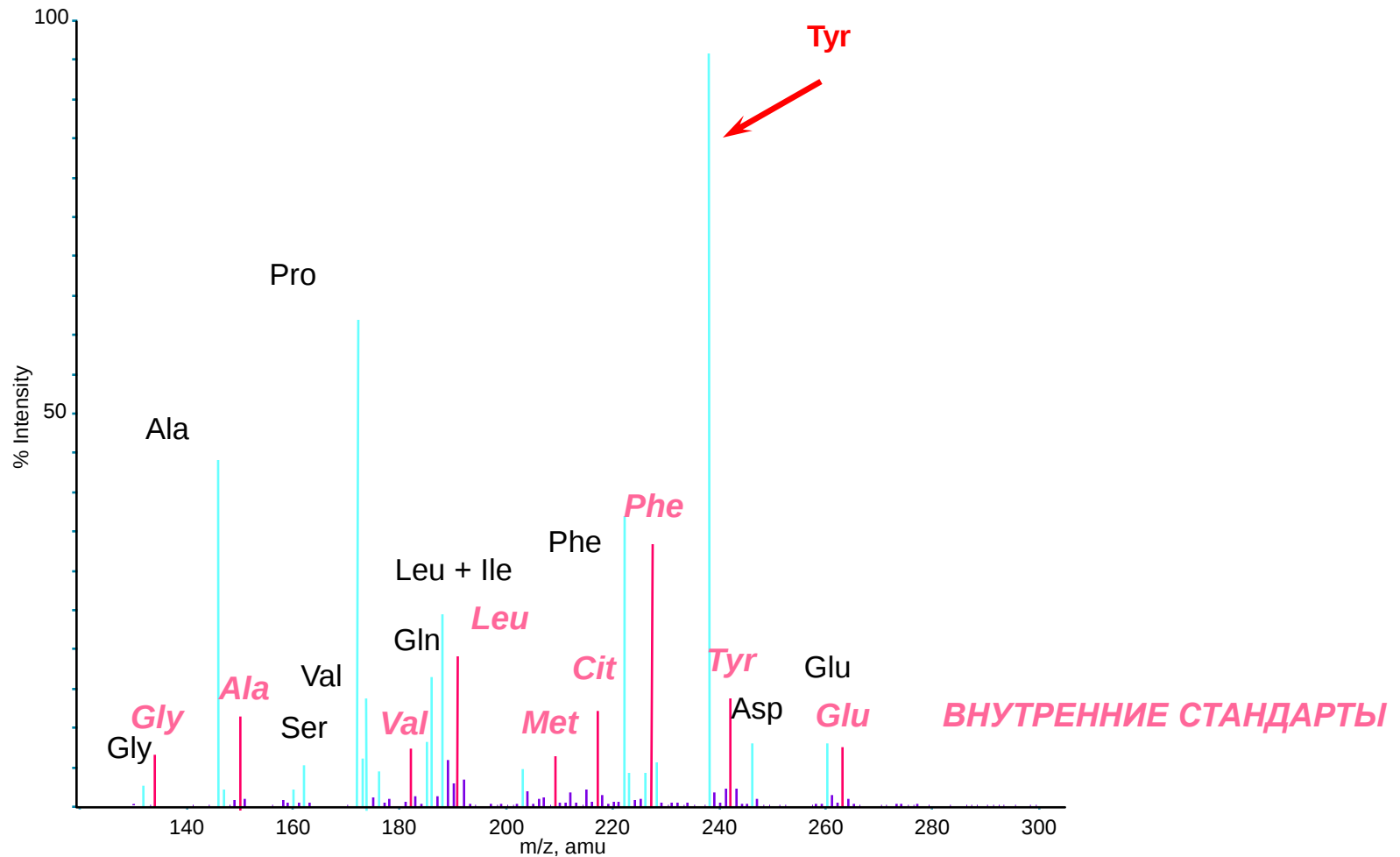
Анализ Аминокислот



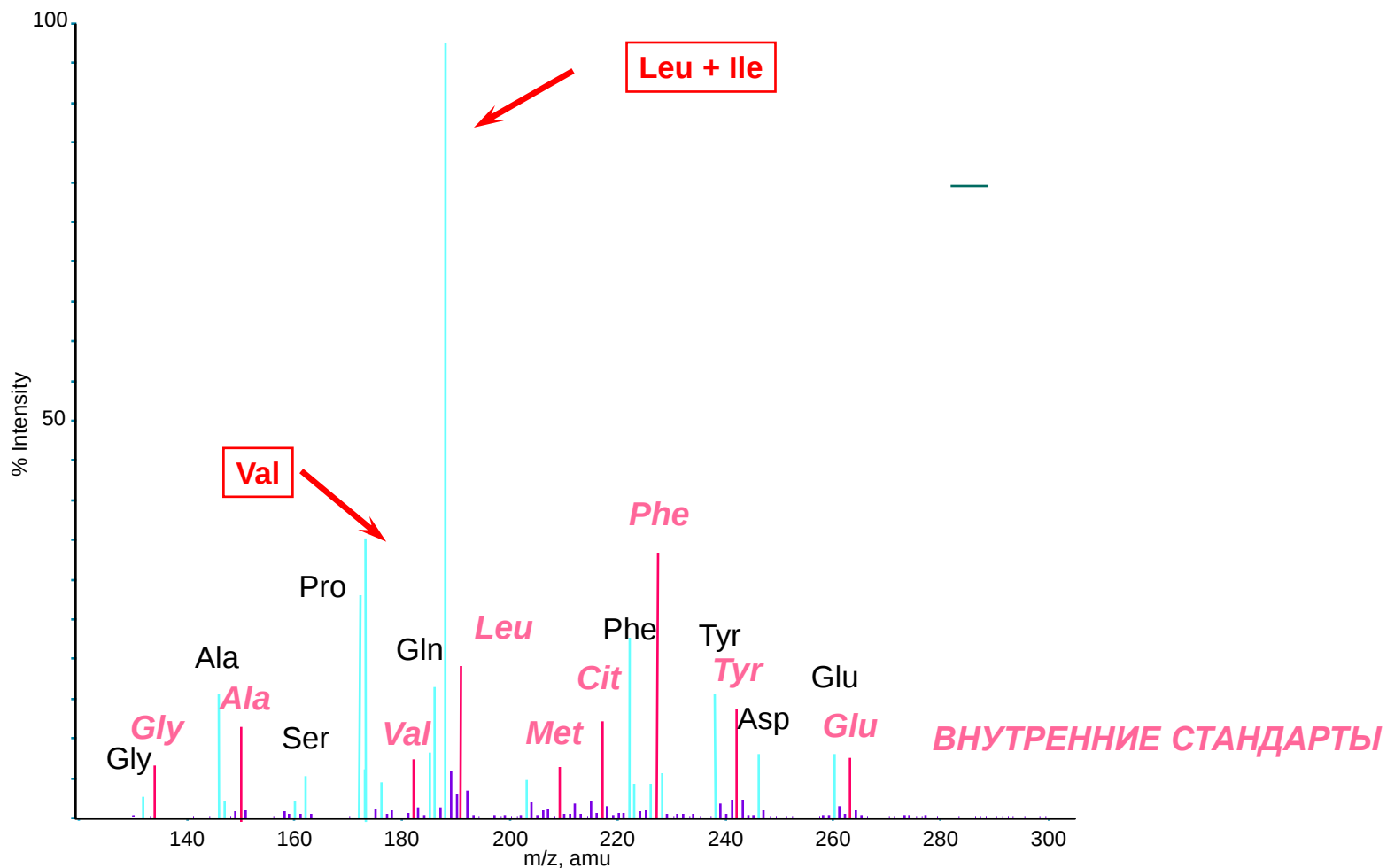
MS/MS данные для аланина



Тирозинемия



Болезнь с запахом кленового сиропа мочи



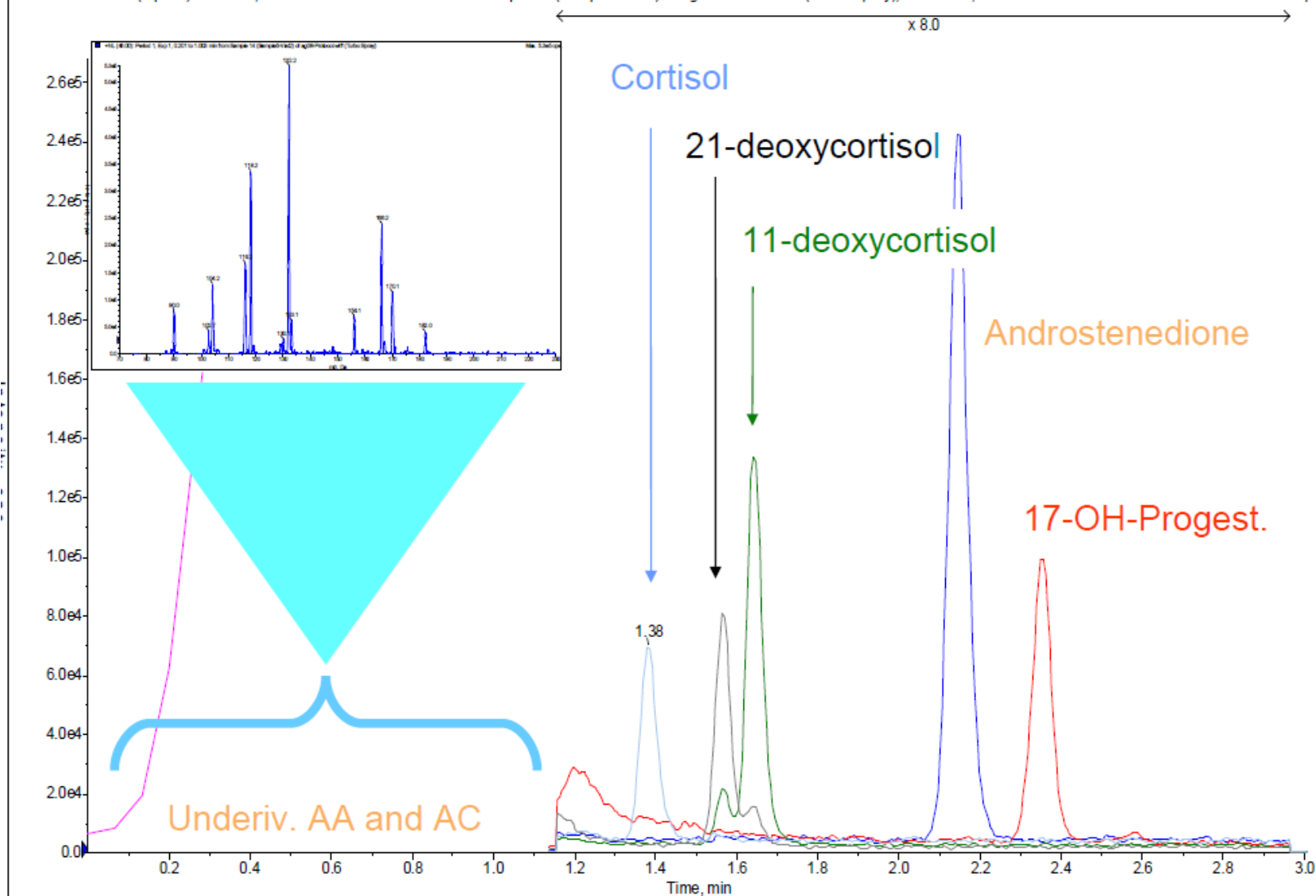


Врожденная Гиперплазия Коры Надпочечников (ВГКН)

Стремление к дальнейшему расширению протокола скрининга НБО

- Включение измерение определенных стероидов связанных с ВГКН, используя упрощенную подготовку образцов в сочетании с полностью автоматизированным рабочим процессом.

XIC of +MRM (5 pairs): Period 2, 363.3/121.1 Da ID: Cortisol from Sample 14 (Sample5-Vial2) of ag06-Protocol.wiff (Turbo Spray), Smoothed, S... Max. 8693.8 cps.



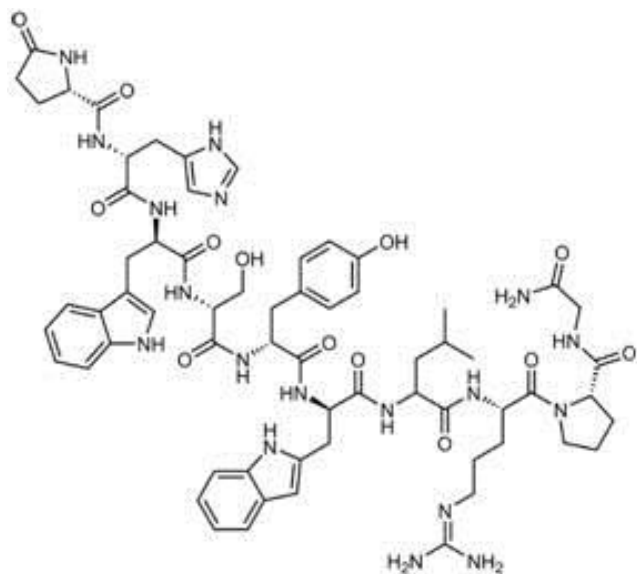


Трипторелин

Количественный анализ высоко-молекулярных соединений

Количественный анализ высоко-молекулярных соединений

- Трипторелин это декапептид. GnRH агонист
- Подобно другим GnRH агонистам, Трипторелин может использоваться во вспомогательной репродукции и при лечении гормонально зависимых раков



$C_{64}H_{82}N_{18}O_{13}$

Molecular Mass: 1311.5 g/mol

Вызов → Требуется очень низкий предел обнаружения

Трипторелин

Противоопухолевый препарат, синтетический аналог гонадотропин-рилизинг гормона (входит в список Жизненно Необходимых и Важнейших Лекарственных Препаратов)

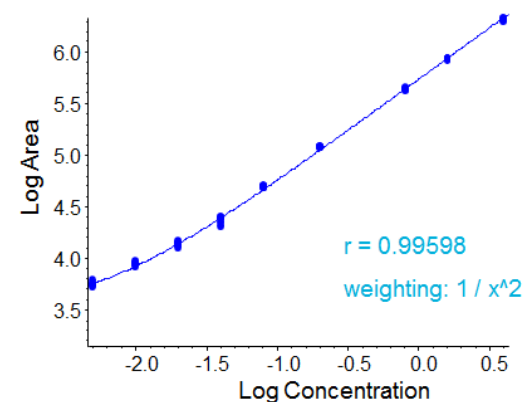
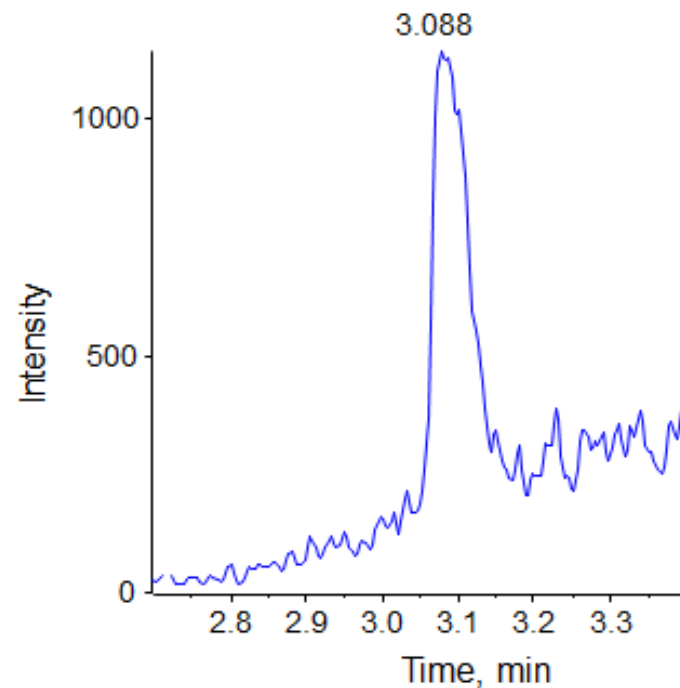
Подавляет секрецию ЛГ, ФСГ и соответственно функцию яичек и яичников. Вследствие этого происходит ингибирование секреции эстрогенов яичниками до состояния менопаузы, а также снижение секреции тестостерона.

Применение: эндометриоз, миома матки, программа ЭКО, раннее половое созревание, гипогонадотропная амеорея. Симптоматическое лечение прогрессирующего гормонозависимого рака предстательной железы (альтернатива хирургической кастрации).

Signal at LLOQ – Matrix Curve

QTRAP® 5500 System

- QTRAP 5500 system signal at LLOQ (40 pg/mL)
 - 6 replicates were performed
 - 305 amol on column:
 - Area %CV- 9.7
 - Accuracy – 102.8 %





Спасибо

akirilyuk@khimexpert.ru