



Применение тандемной масс-спектрометрии в клинической лабораторной диагностике

Мещанкина Т.Е. - Руководитель направления масс-спектрометрии «Агентство Химэксперт»

- Перспективы применения масс-спектрометрии в клинической лаборатории
- Обзор возможностей и применений

Преимущества тандемной масс-спектрометрии в сравнении с иммунохимическими методами

- Высокая селективность и специфичность
- Высокая чувствительность
- Простая и экономичная пробоподготовка
- Короткое время выполнения анализа
- Возможность объединения разных классов аналитов в одном анализе
- Низкие издержки на один образец

Эволюция масс-спектрометрии в диагностике

На сегодняшний день

Интегрированное решение

Специализированный клинический анализатор

Включение в линию

Лабораторные тесты



- Маркировка Class I и CE IVD (2a)
- Опытный персонал
- Загрузка партиями
- Меню ПО вызывается вручную

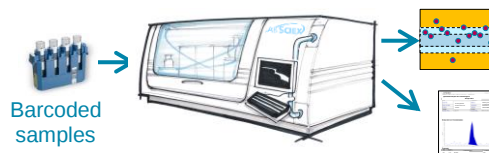
- Нет меню тестов

Интегрированные системы, одобренные регулятором



- Class II (Высокая сложность)
- Автоматизированная пробоподготовка
- Наборы реагентов
- Улучшенное ПО
- Меню тестов

Клинический анализатор

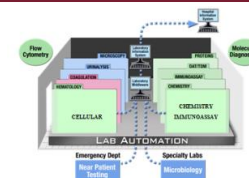
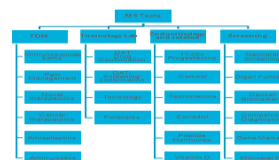
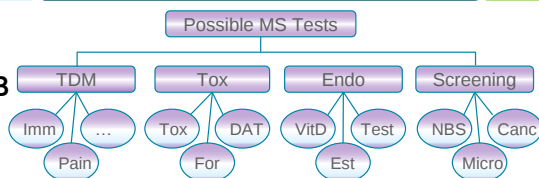


- Средняя сложность, Class II
- Полностью автоматизированные процессы
- Коммуникация через ЛИС
- Обширное меню тестов

Клинический анализатор в линии



- Встраивание в модульный клинический анализатор
- Интеграция в ЛИС
- Средняя сложность Class II
- Полное меню валидированных и утвержденных тестов



Номенклатурная классификация медицинских изделий по видам

Утверждена приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации (Минздрав России) от 25 сентября 2014 г. N 557н

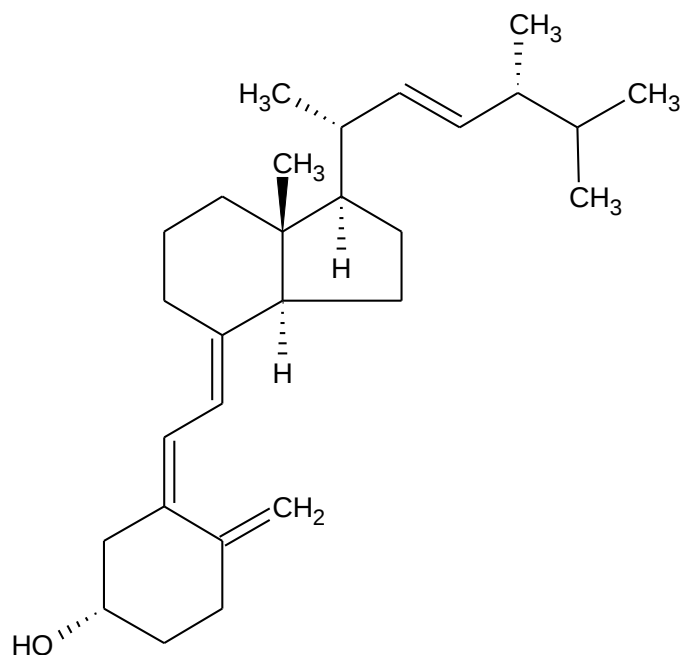
107660	5. Медицинские изделия для in vitro диагностики (ИВД) 5.01. Анализаторы ИВД	Анализатор масс-спектрометрический ИВД, автоматический	Лабораторный аппарат, работающий от сети (на переменном токе), предназначенный для использования при качественном и/или количественном определении химического состава клинического образца с помощью ионизации образца и разделения полученных ионов по массе с помощью электрического и магнитного поля. Устройство работает при минимальном участии техника и полной автоматизации всех процедурных этапов.
107670	5. Медицинские изделия для in vitro диагностики (ИВД) 5.01. Анализаторы ИВД	Анализатор масс-спектрометрический ИВД, полуавтоматический	Лабораторный аппарат, работающий от сети (на переменном токе), предназначенный для использования при качественном и/или количественном определении химического состава клинического образца с помощью ионизации образца и разделения полученных ионов по массе с помощью электрического и магнитного поля. Устройство работает при минимальном участии техника и полной автоматизации всех процедурных этапов. Устройство работает при минимизированном участии техника и частичной, но не полной автоматизации всех процедурных этапов.



Анализ витамина D

Формы витамина D

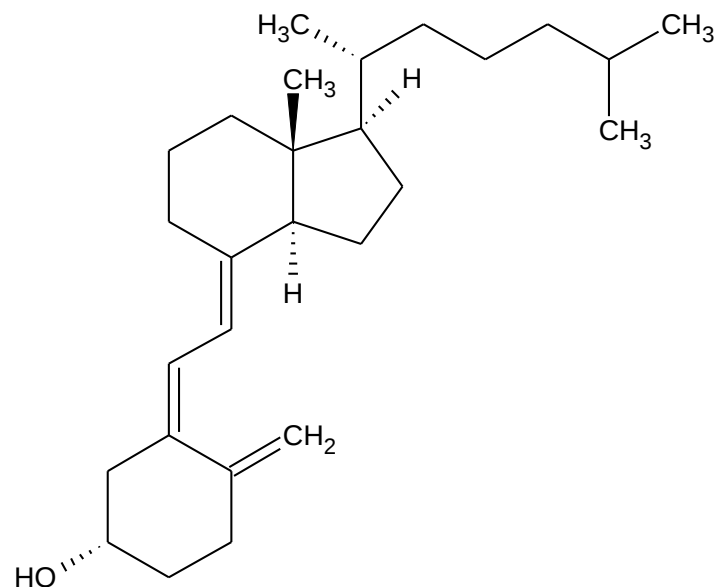
- Две формы витамина D; Витамин D₃ – продукт метаболизма и витамин D₂, поступающий с пищей



Эргокальциферол

Витамин D₂

MW 396.7

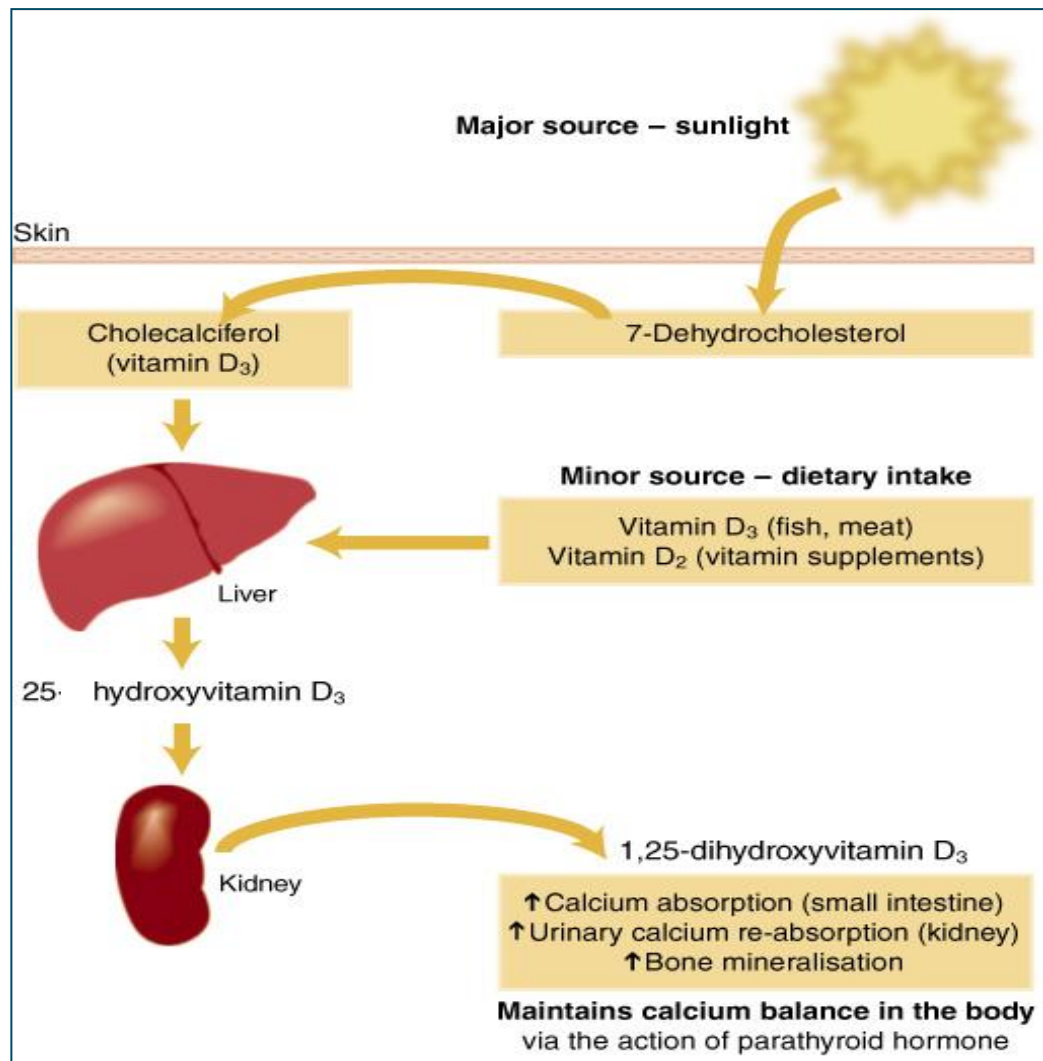


Холекальциферол

Витамин D₃

MW 384.6

Метаболизм витамина D



Зачем измерять 25-гидроксивитамин D?

- Концентрация 25-гидроксивитамин D отражает статус витамина D
- Анализ 25-гидроксивитамин D позволяет сделать выводы о недостатке, дефиците или токсичном уровне витамина D
- Зачем измерять уровень 25-гидроксивитамина D2?
 - Стандартная форма препарата для приема
 - Анализ помогает избежать избыточного потребления препаратов, содержащих витамин D

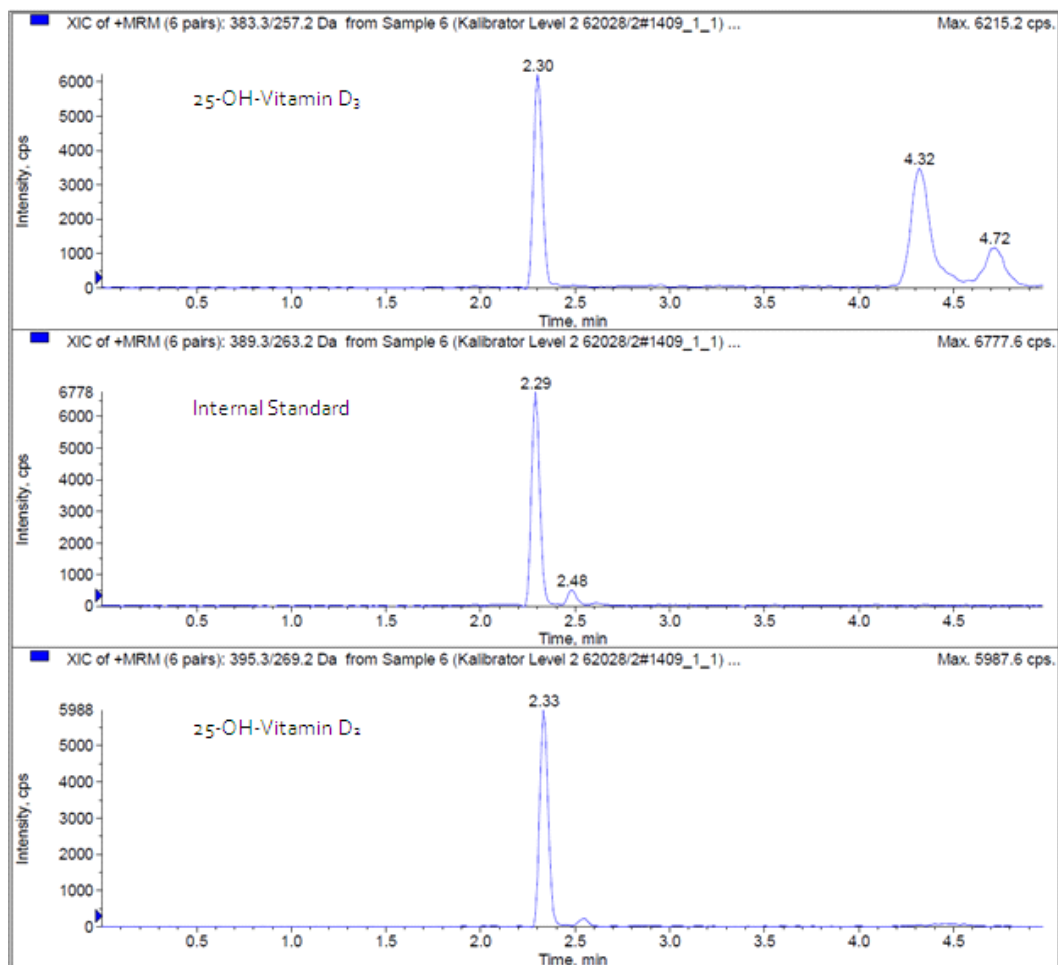
Что необходимо для проведения анализа?



Набор на 1000 тестов:

- Калибраторы
- Контрольные образцы сыворотки
- Внутренний стандарт
- Реагент для преципитации
- Промывочный раствор
- Мобильные фазы
- Вials
- Аналитическая колонка
- Предколонка

Пример хроматограммы



SCIEX IVD-MS™ calibrator level 2 (approx 32µg/L) as expected on an AB SCIEX 3200MD QTRAP® system with a Shimadzu LC system using the SCIEX IVD-MS™ Kit for 25-OH-Vitamin D3/D2 in Serum/Plasma

Аналитические характеристики

Аналит	% CV (Low QC)	% CV (High QC)	LLOQ (мкг/л)
25-ОН-Витамин D ³	2.7	4.2	3.0
25-ОН-Витамин D ²	3.9	4.3	2.2

Эффективность экстракции

Аналит	Сыворотка (%)	Плазма (%)
25-ОН-Vitamin D ³	93	96
25-ОН-Vitamin D ²	95	91



Анализ сухих пятен крови на аминокислоты и ацилкарнитины – неонатальный скрининг

Анализ сухих пятен крови на аминокислоты и ацилкарнитины

Рутинное количественное определение аминокислот и ацилкарнитинов с помощью тандемной масс-спектрометрии - ВЭЖХ/МС/МС (система [AB SCIEX 3200MD Series](#))

- наборы реагентов
- 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

Целевые аналиты

Аминокислоты

Alanine

Glutamic acid

Ornithine

Arginine

Glycine

Phenylalanine

Aspartic acid

Leucine/Isoleucine

Tyrosine

Citrulline

Methionine

Valine

Ацилкарнитины

Carnitine - C18-Carnitine

Хроматографическая колонка не используется!

Пример отчета о выполнении теста на аминокислоты и ацилкарнитины (с маркировкой отклонений)



Created with ClearCore™ MD 1.0 – Quantitation Reporter
Printed: 12/06/2014 2:41:14 PM

Per Sample Report

Sample: High control

Sample			
Data File		Date	
Sample Number	1	Vial	85
Sample Type		Plate	1
Processing Method			

Test Name	Result	Units	Qualifier	LCL	UCL
Alanine	564.121	µM	PASSED	301	1073
Aspartic acid	219.214	µM	PASSED	199	402
Arginine	116.687	µM	PASSED	88	255
Citrulline	217.906	µM	PASSED	200	343
Glutamic acid	520.168	µM	PASSED	476	908
Glycine	378.808	µM	FAILED_TOO_LOW	641	1184
Leucine	411.888	µM	PASSED	355	712
Methionine	178.572	µM	PASSED	92	368
Ornithine	426.593	µM	PASSED	316	693
Phenylalanine	377.894	µM	PASSED	325	730
Tyrosine	422.728	µM	PASSED	353	679
Valine	276.157	µM	PASSED	275	564
C2-Carnitine	59.929	µM	PASSED	41.8	93.2
C3-Carnitine	12.188	µM	PASSED	9.49	19.8
C4-Carnitine	4.116	µM	PASSED	2.49	6.05
C5-Carnitine	1.902	µM	PASSED	1.36	3.46
C5-DC-Carnitine	3.569	µM	PASSED	1.07	3.58
C6-Carnitine	1.867	µM	PASSED	1.39	2.98
C8-Carnitine	2.037	µM	PASSED	1.47	3.33
C10-Carnitine	1.889	µM	PASSED	1.33	3.51
C12-Carnitine	1.849	µM	PASSED	1.48	3.04
C14-Carnitine	1.812	µM	PASSED	1.32	3.12
C16-Carnitine	11.866	µM	PASSED	8.03	18.2
C18-Carnitine	7.406	µM	PASSED	4.79	12.9
alanine/arginine ratio	4.834		PASSED	0	∞



Клиническая токсикология

Методические рекомендации



**МИНИСТЕРСТВО
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минздрав России)
ЗАМЕСТИТЕЛЬ МИНИСТРА**

Рахмановский пер., 3, Москва, ГСП-4, 127994
тел.: (495) 628-44-53, факс: (495) 628-50-58

01 АПР 2015

№ 14-2/10/2-916

На № _____ от _____

Органы исполнительной власти
субъектов Российской Федерации
в сфере охраны здоровья

Министерство здравоохранения Российской Федерации направляет для использования в работе методические рекомендации «Правила проведения химико-токсикологических исследований на предмет наличия в организме обучающихся в общеобразовательных организациях и профессиональных образовательных организациях, а также образовательных организациях высшего образования в целях раннего выявления незаконного потребления наркотических средств и психотропных веществ наркотических средств, психотропных и иных токсических веществ (их метаболитов)», подготовленные Ассоциацией специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины» в соответствии с пунктом 2 статьи 76 Федерального закона от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».

Приложение: 1 брошюра на 10 л.

Скрининг на наркотики

Основные характеристики:

Скрининг более 300 соединений

Время анализа 8-12 минут

Подтверждение с помощью библиотек

Более 1400 веществ в библиотеке

Применимо для крови, мочи, тканей

Готовый iMethod™



Toxicology Screening Workflows on QTRAP® Instruments

Targeted Screening and General Unknown Screening

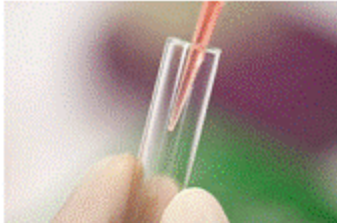
Introduction

Due to the widespread use and abuse of drugs, comprehensive screening for the detection of pharmaceuticals and illicit drugs is an important part of toxicological analysis and is often divided into two categories: targeted screening and general unknown screening.

Targeted screening is a directed screening approach that analyzes samples for a specific list of drugs. This method is often referred to as "multi-target screening", or MTS, and currently constitutes the majority of the screening tests performed. The types of drugs used or abused are often limited to a few hundred compounds; therefore, most MTS methods are focused on detecting a subset of the most commonly used drugs. Restricting the analysis in this way allows the use of sensitive and selective workflows, providing detection of low concentrations of drugs in complex biological matrices. Since this approach detects only those compounds selected, a priori, it will not reveal the presence of a compound not included in the target drug list.

While the majority of screening tests are targeted, interest in general unknown screening (GUS) is continuing to grow. GUS does not use a target analyte list, so the analysis is sensitive to detection of unexpected pharmaceuticals, nutritional supplement-based analytes, and designer drugs. The trade off for GUS is a slight compromise in the level of detection. In many applications, this limitation is minor given the benefit of identifying unpredicted analytes.

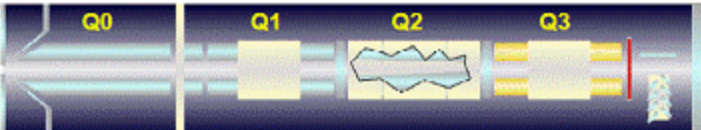
Screening has traditionally been performed using immunoassay, liquid chromatography with ultra-violet detection (LC/UV), or gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS).



Immunoassays are widely used because they are inexpensive, sensitive, and easy to implement. However, these tests are only available for a limited number of drug classes, suffer from a lack of specificity due to cross reactivity, and are not easily adapted to detect new drugs. Furthermore, multiple analytes must be performed for complete compound coverage when screening for drugs across several classes.

LC/UV based methods also suffer from a lack of specificity. UV spectra are derived from the UV absorption of specific functional groups so compound identification still requires confirmation against a pure standard. Unambiguous compound identification and quantification also requires the target analyte to be completely resolved from neighboring components, which may necessitate long LC runtimes. Unfortunately, long runtimes are not compatible with the high throughput demands of most drug screening laboratories.

Figure 1. QTRAP® system ion path.

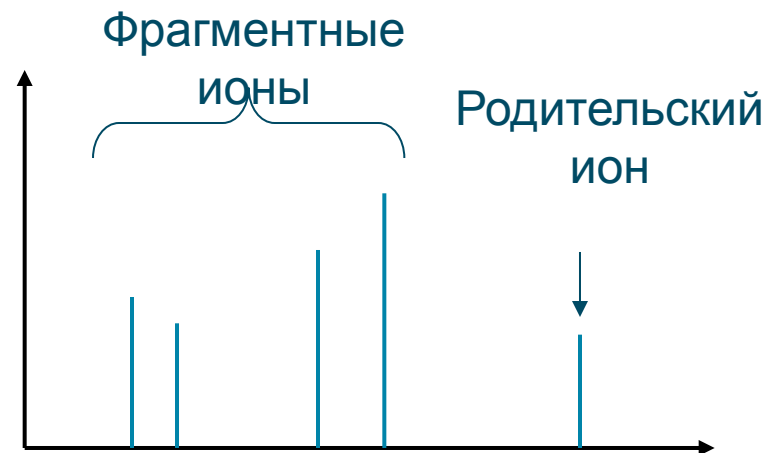


The instrument operates as a true triple quadrupole instrument, using Q1 and Q3 as mass filters and Q2 as a collision cell. In this hybrid instrument, Q3 functions as a linear ion trap, allowing rapid acquisition of sensitive full-scan MS and MS/MS spectra.

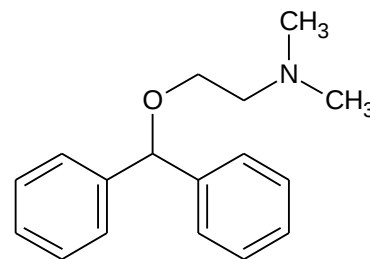
Использование МС/МС библиотек



Отпечаток пальца



Химический отпечаток пальца



Многоцелевой скрининговый подход с MRM детектированием

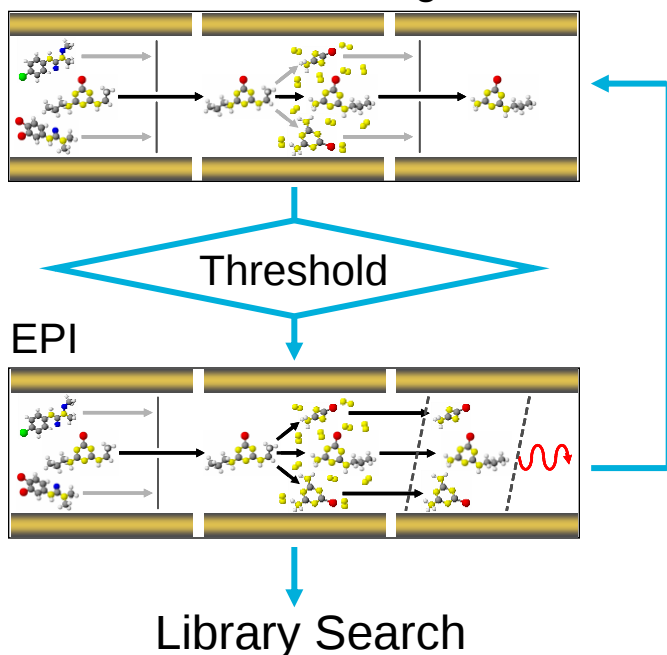
MRM детектирование отличается чувствительностью и селективностью

МС/МС библиотеки для подтверждения

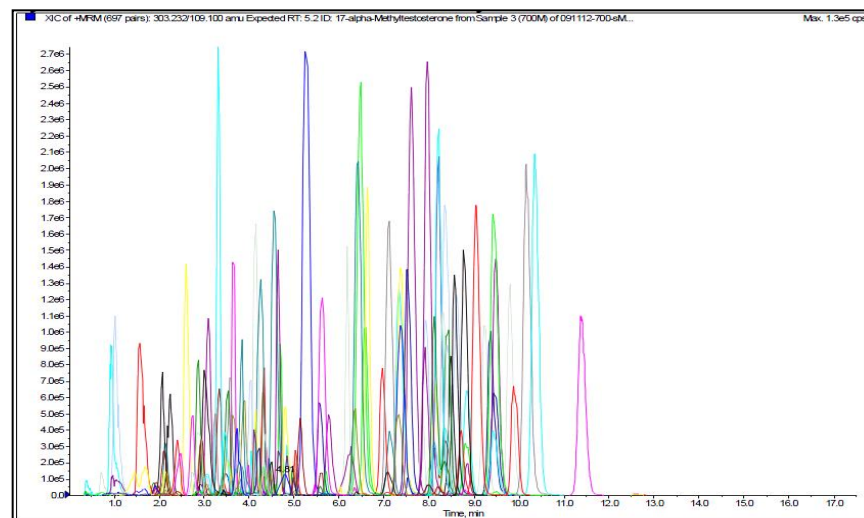
Возможен скрининг сотен соединений

Детектируются только соединения “из списка”

Scheduled MRM™ Algorithm



Пример: Скрининг мочи на 700 соединений
SCIEX 3200 Q TRAP®



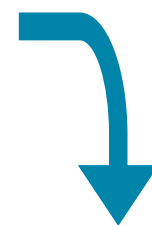
Общий скрининг неизвестных

Полный скан идентифицирует все соединения и метаболиты

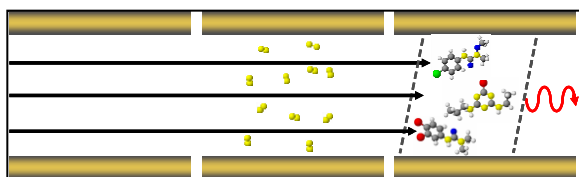
Библиотеки MS/MS используются для подтверждения

Необходима хорошая автоматизация обработки данных

Чувствительность и селективность хуже чем в MPM

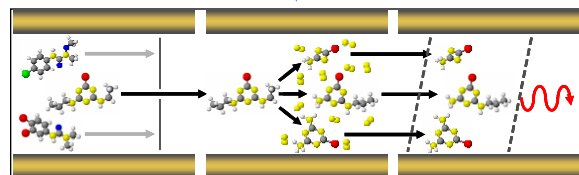


EMS

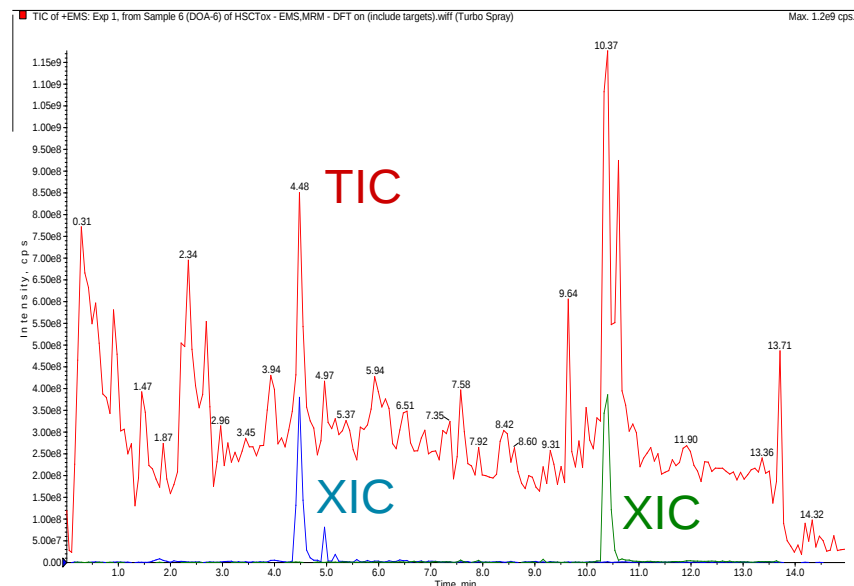


Threshold

EPI



Library Search



Прочие приложения

- **Анализ стероидов**
 - Панель стероидов
 - Тестостерон
 - Низкие концентрации тестостерона
 - Эстроген/Эстрадиол
- **Биомаркеры**
 - Гомоцистеины
 - Гомованилиновая кислота
 - Метанефрины
 - T3/T4/FT3/FT4
 - Этилсульфаты и этилглюкорониды
 - Метаболиты никотина
 - ММА
 - Гемоглобинопатии

Выводы

- Тандемная масс-спектрометрия – универсальная технология с большим потенциалом применения в клинических лабораториях
- Масс-спектрометрия является альтернативой иммунохимическим методам и позволяет повысить достоверность, снизить издержки, снизить количество выполняемых анализов
- Технология AB SCIEX разработана с учетом обширного опыта в области клинических исследований, что дает уверенность в успешном внедрении в клиническую лабораторную диагностику масс-спектрометров API 3200MD™ & 3200MD QTRAP®, 4500MD и наборов реагентов

Потому что достоверные клинические результаты стоят того



Экспертная
поддержка и
лучшая из
доступных
технологий



Answers for Science.
Knowledge for Life.™

