

**REFERENCIA MÉRÉSI ELJÁRÁSOK FEJLESZTÉSE LC-MS
MÓDSZERREL A KLINIKAI KÉMIÁBAN**

PHD TÉZIS RÖVID ÖSSZEFOGLALÓ

MOLNÁR PETRA MAGDOLNA

INSTAND E.V. GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER
QUALITÄTSSICHERUNG IN MEDIZINISCHEN LABORATORIEN E.V.

DÜSSELDORF, NÉMETORSZÁG

ÉS

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI
KAR BIOKÉMIAI INTÉZET, SZEGED

2012.

BEVEZETŐ

Magyarországon az orvosi laboratóriumok számára kötelező külső minőségellenőrzési programban (EQAS) részt venni, habár a célértékek meghatározására és az elfogadási tartományok megállapítására nemzeti irányelv nem elérhető. Magyarország követi az In vitro diagnosztikai orvostechnikai eszközökről szóló direktívákra (IVD MDs, 98/79/EC), az ISO/IEC 17043:2009 és a szintén harmonizált MSZ EN 14136:2004 szabványokra vonatkozó szabályozásokat. A QualiCont In Vitro Diagnosztikai Minőségellenőrzési Nonprofit Közhasznú Kft. a magyarországi külső minőség-ellenőrzés (EQA) megszervezésében az MSZ EN 14136:2004 szabvány követelményeire támaszkodik, valamint az ISO/IEC 17043:2009 szabvány követelményeinek kíván megfelelni. Az MSZ EN 14136:2004 és az ISO/IEC 17043:2009 szabványok a referencia mérési eljárások (RMP) használatát ajánlják összhangban az MSZ EN ISO 17511:2004 szabvány alapján leírt visszavezethetőséggel (traceability) és meghatározzák a mérési bizonytalanság (uncertainty of measurement) mértékét a célértékek (target value) megállapításához. Összhangban ezekkel a szabályokkal, a QualiCont Kft. több módszer esetében is referencia mérési eljárásokkal megállapított célértéket használ külső minőségellenőrzési programjaiban (EQAS).

Az orvosi laboratóriumokban rutin mérésekhez a HbA_{1c} meghatározására és a terápiás gyógyszer szint mérésre legtöbbször nagy átbecsítőképességű diagnosztikai módszereket (high-throughput procedures) alkalmaznak. A leggyakrabban alkalmazott elvek ezekhez a mérésekhez az immunológiai módszerek. Az immunológiai módszerekkel mért értékeknek a különböző kalibrációk miatt nem megfelelő összehasonlíthatóságuk van, melyet külső minőségellenőrző programok kimutattak. A legmagasabb szintű pontosság biztosításához a nem megfelelő összehasonlíthatóság áthidalására referencia mérési módszerek és tanúsított referencia anyagok kerültek fejlesztésre a gyártók rutin mérési tesztjeinek kalibrálására. A CEN és az ISO standardok megkövetelik a referencia mérési eljárások és a tanúsított referencia anyagok (CRM) használatát.

A referencia mérési eljárások fejlesztésének követnie kell az MSZ ISO 15193:2009 szabvány előírásait. Jelen munka referencia mérési eljárásai követik az ISO szabvány előírásait.

Az International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) létrehozott a HbA_{1c} standardizációjára egy munkacsoportot (Working Group on Standardization of HbA_{1c}). A referencia mérési eljárás kalibrációjának alapja a tiszta HbA₀ és HbA_{1c} elsődleges referencia anyagként (primary reference material) alkalmazása kapilláris elektroforézis (CE) és folyadékkromatográfiás-tömegspektrometriás (LC-MS) módszereknél.

Az immunszuppresszív szerek nagyon szűk terápiás tartományt, intra- és interindividuális farmakokinetikai és farmakodinamikai variabilitást mutatnak. A terápiás gyógyszer szint monitorozás célja az egyénre szabott immunszuppresszív terápia megvalósítása. Jelenleg a terápiás gyógyszer szint monitorozásra immunológiai és kromatográfiás módszerek érhetőek el. A rutin laboratóriumokban az immunológiai módszereket használják a legtöbb esetben, melyek nem csak magát a gyógyszert határozza meg, hanem azok aktív és inaktív metabolitjait is.

CÉLKITŰZÉS

A munka célja, a betegellátás javítása a referencia mérési eljárások legmagasabb metrológiai szintjének megvalósításán keresztül a standardizációs eljárást bevezetni az orvosi laboratóriumokban. Ebben a munkában két LC-MS referencia mérési eljárás került fejlesztésre. A HbA_{1c} esetében a korábban fejlesztett referencia mérési eljárás igényelt nagyobb határozottságot (robustness). Az immunszuppresszív szerek meghatározására eddig nem volt elérhető referencia mérési eljárás. A referencia mérési eljárás izotóppal jelölt belső standard felhasználásával került fejlesztésre.

MÓDSZEREK

HbA_{1c} meghatározása: Bináris grádiens elválasztást alkalmaztunk, mely A eluensből (0.1% hangyasav vízben) és B eluensből (0.1% hangyasav acetónirillben) áll. A minták előkészítése az IFCC referencia mérési eljárása

alapján történt. A referencia mérési eljárás alapja a glikált és a nem-glikált hemoglobin arányának meghatározása. Az elválasztás C12 fordított fázisú Jupiter Proteo oszlopon történt, 300 µL/perc áramlási sebességgel, 50 °C-os oszlophőmérsékleten és 1 µL injektálási térfogattal. A duplán protonált β-N-terminális hexapeptidek detektálása m/z 348.3 HbA₀ és m/z 429.3 HbA_{1c} tömegeken történt.

Cyclosporin A, Sirolimus, Tacrolimus és Everolimus meghatározása: A kromatográfiás elválasztáshoz tercier grádiens elúciót alkalmaztunk (A eluens: 0.1 % v/v hangyasav vízben + 0.1 mmol/L Cs formiát, B eluens: 0.1 % v/v hangyasav metanolban + 0.1 mmol/L Cs formiát és C eluens: 0.1 % v/v hangyasav acetonitrilben + 0.1 mmol/L Cs formiát). A kromatográfiás elválasztáshoz phenylhexyl fordított fázisú oszlopot használtunk, 300 µL/min áramlási sebességgel, 50 °C-ra termosztálva. A natív és az izotóppal jelölt belső standardok esetében a precursor ionok (m/z) Cyclosporin A 1335.0, [²H₁₂]-cyclosporin A 1347.3, Sirolimus (Rapamycin) 1046.5, [¹³C,²H₃]-rapamycin 1050.6, Tacrolimus 936.4, [¹³C,²H₂]-tacrolimus 939.2, Everolimus (42-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin) 1090.5, [¹³C₂,²H₄]-42-O-(2-hydroxyethyl)rapamycin 1096.6. A detektált tömeg m/z 132.9, a Cs⁺ ion, SRM módban. A módszer validálásához metanolban oldott standard törzsoldatot, gyógyszermentes EDTA teljes vérből előállított „spike” mintát, gyári kalibrátort, valamint immunszuppresszív terápiában részesülő vesetranszplantált páciensek EDTA teljes vér mintáját használtuk fel. Belső standardként izotóppal jelölt komponenseket alkalmaztunk 1:1 jelölt/jelöletlen arányban minden analit esetében. A teljes vérminták minta-előkészítésére folyadék-folyadék extrakciós eljárást fejlesztettünk.

EREDMÉNYEK ÉS KONKLÚZIÓ

A diabétesz mellitus menedzselésére és az immunszuppresszív szerek terápiás gyógyszer szint monitorozására alkalmas magas pontosságú és precizitású analitikai eljárások fejlesztettünk, amelyek teljesítik a referencia mérési eljárások előírásait.

ÚJ EREDMÉNYEK A HbA_{1c} MEGHATÁROZÁSBAN

A HbA_{1c} meghatározására az LC-MS analitikai eljáráson alapuló módszerét fejlesztettük tovább egy robusztusabb, precízebb és pontosabb módszerré.

- ✓ A csúcsalak javítása C12 fordított fázisú Jupiter Proteo analitikai oszlop alkalmazásával.
- ✓ A TFA helyettesítése hangyasavval az elúciós pufferben növeli a csúcs élességét és a jel intenzitását
- ✓ Az injektált mennyiség csökkentése 1 µL-re.
- ✓ Az újonnan kidolgozott módszert az IFCC HbA_{1c} standardizációs munkacsoportja elismerte új és leendő referencia mérési eljárásként (RMP).

ÚJ EREDMÉNYEK AZ IMMUNSZUPPRESSZÍV SZEREK MEGHATÁROZÁSBAN

Egy referencia mérési eljárást fejlesztettünk az immunszuppresszív szerek meghatározására LC-IDMS/MS analitikai módszeren alapulva.

- ✓ A stabil izotópok belső standardként alkalmazásával a módszer a legpontosabb mennyiségi meghatározási technikának tekinthető és így referencia mérési eljárásként alkalmazható.
- ✓ Tömegspektrometriás detektálásra a Cyclosporin A, Sirolimus, Tacrolimus és Everolimus cézium addukt formáját alkalmaztuk SRM módban.
- ✓ Folyadék-folyadék extrakciós mintaelőkészítési technikát fejlesztettünk az immunszuppresszív szerek EDTA teljes vérmintából meghatározására.
- ✓ Az újonnan fejlesztett módszer értékelése követi az ISO 15193:2009 szabvány előírásait.

Összefoglalva, olyan referencia mérési eljárásokat hoztunk létre a HbA_{1c} és az immunszuppresszív szerek meghatározására, amelyek alkalmasak páciens minták mérésére, analitikai rendszerek hitelesítésére és EQA rendszerek célértékkel történő kiértékelésére a lehető legmagasabb szintű pontossággal.