

LC-MS και εφαρμογές του στη Βιοανάλυση

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

Ιωάννης Παπουλίδης, BSc.(Hons), MSc

Μοριακός Βιολόγος

Διευθυντής – ΕΥΡΩΓΕΝΕΤΙΚΗ Α.Ε.

NEWBORN SCREENING BLOOD COLLECTION FORM
BY USE ONLY FOR THIS

LAB ID: 06752821

NAME: Doe
DOB: 03/11/88
SEX: M
ETHNICITY: 5555
MOTHER'S NAME: Jane
MOTHER'S DOB: 03/11/88
MOTHER'S ETHNICITY: 5555
MOTHER'S LAB ID: 9999999999
MOTHER'S PHONE: 0208
MOTHER'S ADDRESS: 1 ANY STREET, BUFFALO, NY 14201
MOTHER'S PHONE: 716 333-3333
MOTHER'S CITY: ERIE

LABORATORY COPY



LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

- Γενετικές ανωμαλίες – Στην πλειοψηφία τους αυτοσωμικά υπολειπόμενα μονογονιδιακά νοσήματα
- Οφείλονται σε συγγενή έλλειψη/υπολειτουργία κάποιου ενζύμου
- Η συχνότητα των μεταβολικών νοσημάτων στην βόρεια Αμερική και στην κεντρική και βόρεια Ευρώπη είναι ~1:5000
- Η έγκαιρη διάγνωση τους είναι πολύ σημαντική, καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις, με κατάλληλη θεραπεία, η εκδήλωση των συμπτωμάτων μπορεί να περιοριστεί, ακόμα και να αποτραπεί
- Με μία απλή ανάλυση σε δείγμα αίματος που λαμβάνεται από την πτέρνα του νεογνού, είναι δυνατή η ταυτοποίηση πολλών διαταραχών του μεταβολισμού



LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΣΤΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΗΛΙΚΙΕΣ

ΝΕΟΓΝΑ-ΒΡΕΦΗ

Λήθαργος
Κώμα
Υποτονία
Σπασμοί
Αναπνευστική δυσχέρεια
Ασυνήθιστη οσμή (ιδρώτας, ούρα)
Ίκτερος
Δυσμορφία
Οργανομεγαλία
Δυσκολία στην διατροφή
Ανεπαρκής πρόσληψη βάρους

ΝΗΠΙΑ

Υποτροπιάζοντες εμετοί
Αταξία
Οξεία ηπατοεγκεφαλοπαθεια
Διαταραχή στον μυϊκό τόνο
Δυσμορφία η τραχεία χαρακτηριστικά
Σκελετικές ανωμαλίες
Ανωμαλίες στα μαλλιά η στο δέρμα
Δυσκολία στην διατροφή
Ανεπαρκής πρόσληψη βάρους
Ηπατική δυσλειτουργία
Ψυχοκινητική καθυστέρηση
Απώλεια πνευματικών λειτουργιών
Διαταραχές στην ακοή / όραση

ΠΑΙΔΙΑ ΣΧΟΛΙΚΗΣ ΗΛΙΚΙΑΣ-ΕΦΗΒΟΙ-ΕΝΗΛΙΚΕΣ

Ήπια έως βαρεία νοητική καθυστέρηση
Αυτισμός
Διαταραχές στην μάθηση
Διαταραχές στην συμπεριφορά
Ψευδαισθήσεις
Παραλήρημα
Επιθετικότητα
Ανησυχία
Κρίσεις πανικού
Σπασμοί
Ζάλη / ίλιγγος
Δυσανεξία στην άσκηση
Μυϊκή αδυναμία



LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΝΕΟΓΝΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ

Ταχύτατος έλεγχος νεογνών για διαταραχές του μεταβολισμού



Σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος, ενημέρωση υπεύθυνου ιατρού



Επιβεβαιωτικές εξετάσεις και έναρξη ιατρικής θεραπείας για τον περιορισμό ή αποτροπή συμπτωμάτων



Μείωση ποσοστού νοσηρότητας, αναπηρίας και θνησιμότητας νεογνών με μεταβολικό νόσημα

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

ΕΠΙΛΟΓΗ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΝΕΟΓΝΙΚΟ ΕΛΕΓΧΟ

- Πρέπει να εμφανίζεται συχνά και να αποτελεί ένα δημόσιο πρόβλημα υγείας
- Η μέθοδος ελέγχου του νοσήματος πρέπει να είναι αξιόπιστη, απλή, ταχεία, ευαίσθητη και να έχει πολύ μικρό ποσοστό εμφάνισης ψευδώς θετικών και αρνητικών αποτελεσμάτων
- Πρέπει να υπάρχει δυνατότητα θεραπείας της ασθένειας ή περιορισμός των πιο βαρειών συμπτωμάτων της, όπως ο θάνατος
- Η έγκαιρη εφαρμογή της θεραπείας να βελτιώνει την ποιότητα ζωής του ασθενούς
- Πρέπει να υπάρχει ένας καθιερωμένος αριθμός περαιτέρω ελέγχων για τη διάγνωση του νοσήματος σε περίπτωση θετικού αποτελέσματος

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

TANDEM MS (LC-MS/MS) -Ταυτοποίηση περισσότερων από 45 διαταραχών του μεταβολισμού των αμινοξέων, των λιπαρών οξέων και των οργανικών οξέων

Αμινοξεοπάθειες

Argininemia
Argininosuccinate Synthetase Deficiency
Argininosuccinate Lyase Deficiency
Carbamoylphosphate Synthetase Deficiency
Citrullinemia
Homocystinuria
Hypermethioninemia
Hyperammonemia, Hyperornithinemia,
Homocitrullinemia(HHH Syndrome)
HyperOrnithinemia with Gyral Atrophy
Maple Syrup Urine Disease (MSUD)
Transient Neonatal Tyrosinemia
Tyrosinemia Type I
Tyrosinemia Type II
Tyrosinemia Type III

Οργανικές Οξυουρίες

Carnitine Translocase Deficiency
Carnitine Palmitoyl Transferase Def. Type I
Carnitine Uptake Defect
3-Hydroxy Long Chain Acyl-Coa Dehydrogenase Def
2,4 Dienoyl Coa Reductase Deficiency
Medium Chain Acyl Coa Dehydrogenase Def.
Multiple Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency
Neonatal Carnitine Palmitoyl Transferase Def. Type II
Short Chain Acyl CoA Dehydrogenase Def
Short Chain Hydroxy Acyl CoA Dehydrogenase Def.
Trifunctional Protein Deficiency
Very Long Chain Acyl CoA Dehydrogenase Def.
3-Hydroxy-3 Methylglutaryl CoA Lyase Deficiency
Glutaric Acidemia Type I
Isobutyryl CoA Dehydrogenase Deficiency
Isovaleric Acidemia

β - οξειδωση

2-Methylbutyryl CoA Dehydrogenase Deficiency
3 Methylcrotonyl CoA Carboxylase Deficiency
3 Methyl Glutaconyl CoA Hydratase Deficiency
Methyl Malonyl CoA Mutase Deficiency
Methyl Malonyl CoA Mutase Deficiency +
AdenosylCobalamin Synthesis defects
Maternal Vitamin B12 Deficiency
Mitochondrial Acetoacetyl CoA Thiolase Deficiency
Propionic Acidemia
Multiple CoA Carboxylase Def.
Malonic Aciduria
Nonketonic Hyperglycinemia

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

Γιατί η μέθοδος tandem MS θεωρείται η πλέον καταλληλότερη στον νεογνικό έλεγχο;

Με τη μέθοδο Tandem MS δίνεται η δυνατότητα να εντοπιστούν και να ποσοτικοποιηθούν ενώσεις σε πολύπλοκα μείγματα με μεγάλη ταχύτητα, ευαισθησία και ακρίβεια χωρίς να χρειάζεται η χρήση χρονοβόρων διαδικασιών διαχωρισμού

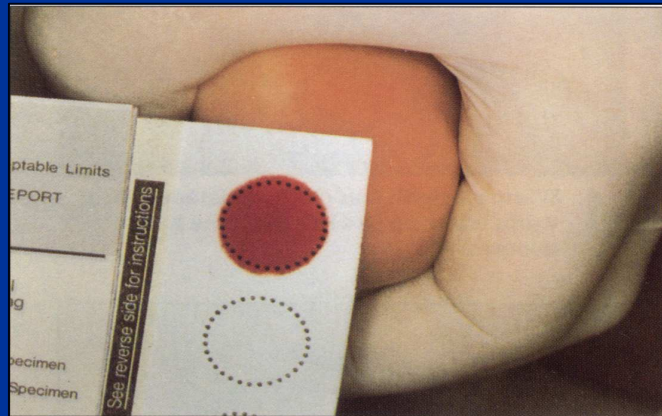
LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

Με το tandem MS αναλύονται συγκεκριμένα αμινοξέα και ακυλοκαρνιτίνες

- 35 ακυλοκαρνιτίνες και 11 αμινοξέα αναλύονται ταυτόχρονα
 - Το MS/MS ρυθμίζεται να αναλύει ειδικά τους δείκτες «στόχους»
 - Σταθεροί πρώτυποι δείκτες (internal standards) χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των δεικτών
 - Οι τιμές συγκρίνονται με τις φυσιολογικές τιμές για τον κάθε δείκτη
 - Στα θετικά δείγματα ακολουθούν επιπλέον αναλύσεις για την επιβεβαίωση της παρουσίας νοσήματος

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

- Από την ειδική κάρτα Guthrie χρησιμοποιούνται δείγματα διαμέτρου 3mm
- Οι δείκτες εξαγονται σε οργανικό διαλύτη όπου έχουν προστεθεί οι πρότυποι δείκτες
- Ακολουθεί εστεροποίηση και επαναδιάλυση σε ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα
- Η ποσότητα του κάθε δείκτη υπολογίζεται σε σχέση με αυτή του αντίστοιχου ειδικού πρότυπου δείκτη και μετατρέπεται σε συγκέντρωση όπου συγκρίνεται με τιμές φυσιολογικών συγκεντρώσεων (cut-offs)



LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

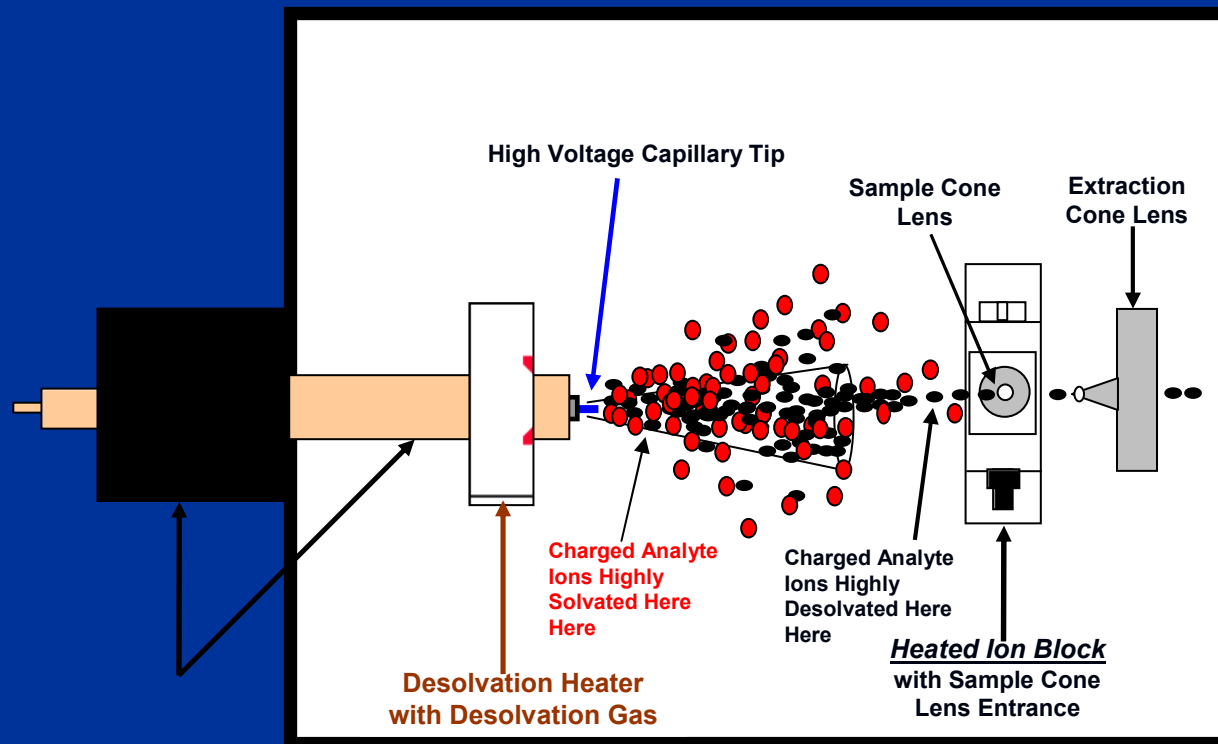
“Cut-offs”

- Εργαστηριακός όρος που περιγράφει το ανώτερο ή/και κατώτερο όριο του φυσιολογικού εύρους τιμών για κάποιον συγκεκριμένο δείκτη
- Καθορίζονται από στατιστική ανάλυση σε μεγάλο αριθμό δεδομένων
- Μπορεί να διαφέρουν από πληθυσμό σε πληθυσμό αλλά και από εργαστήριο σε εργαστήριο και πρέπει να αναπροσαρμόζονται σε τακτικά χρονικά διαστήματα

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

Electrospray ionization (ESI)

➤ Εξάτμιση του διαλύματος και μεταφορά των ιόντων από υγρή σε αέρια φάση

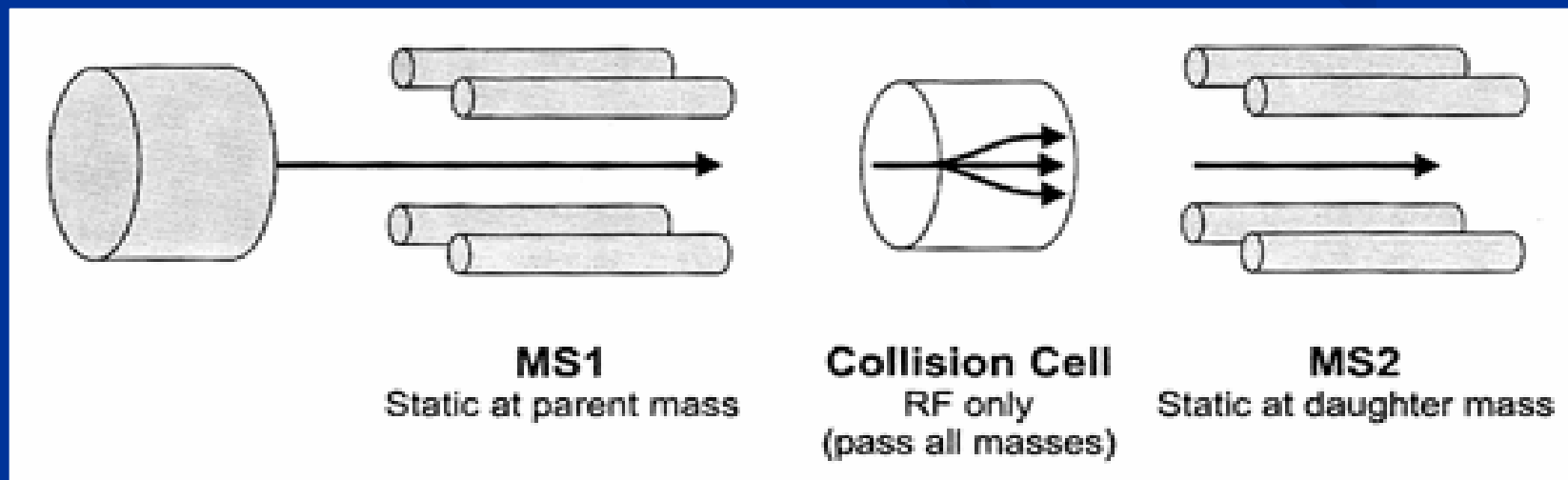


- Διασπορά των φορτισμένων σωματιδίων
- Εξάτμιση του διαλύματος
- Διαχωρισμός των ιόντων από τα φορτισμένα σωματίδια

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

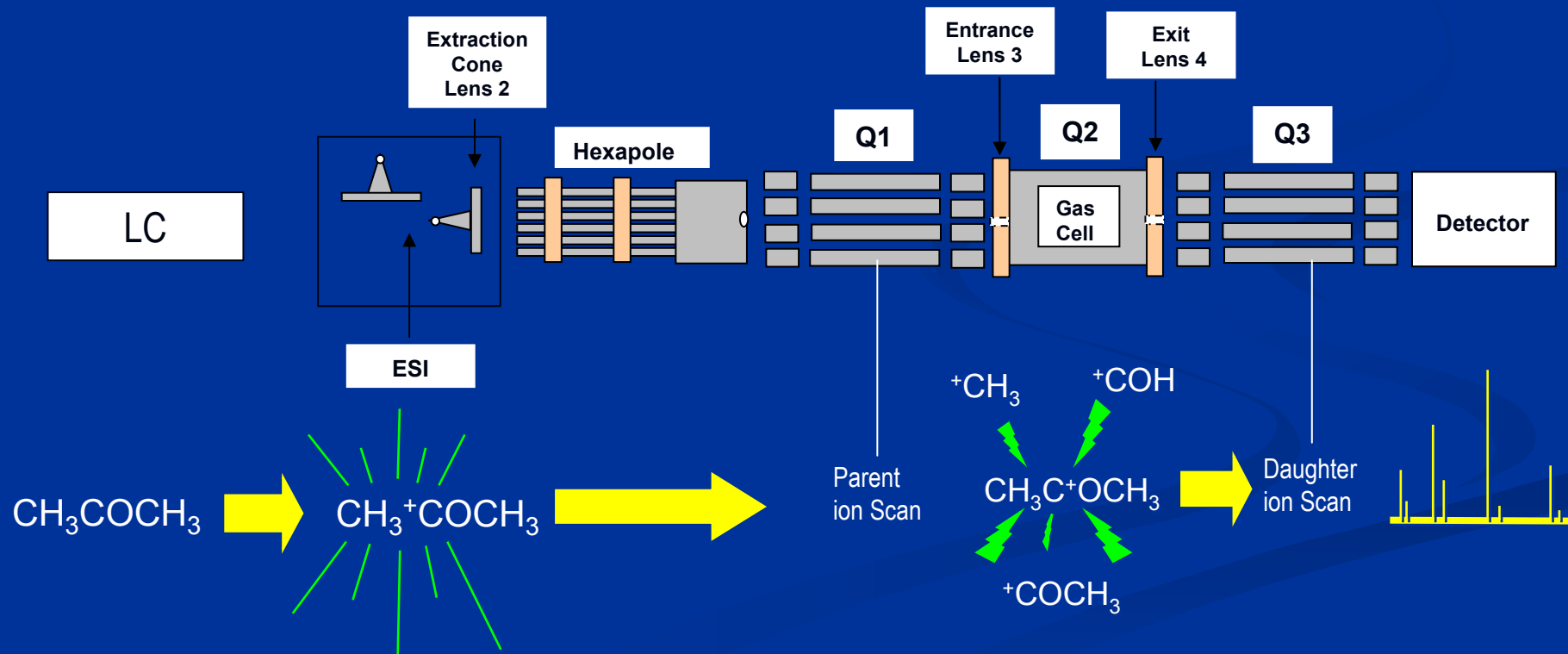
MULTIPLE REACTION MONITORING (MRM)

- Q1 (MS1 - ρυθμισμένο σε συγκεκριμένη μάζα): επιλέγει το επιθυμητό ιόν και απομακρύνει τα υπόλοιπα βάση m/z .
- Collision cell: θραυσματοποίηση
- Q3 (MS2 - ρυθμισμένο σε συγκεκριμένη μάζα): Επιλέγει το χαρακτηριστικό τμήμα που προκύπτει από κάθε ιόν



LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

TRIPLE QUADRUPOLE



LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ (ΑΜΙΝΟΞΕΟΠΑΘΕΙΕΣ)

ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΝΟΣΗΜΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (μΜ)
Argininemia	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Arginine : 10,41
	φ.τ. (Arginine < 250)	
Arginosuccinic Aciduria (ASA Lyase Deficiency)	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Citrulline : 26,70
	φ.τ. (Citrulline < 85)	
Carbamoylphosphate Synthetase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Glutamine : 333,20
	φ.τ. (Glutamine < 930)	
Citrullinemia	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Citrulline : 26,70
	φ.τ. (Citrulline < 85)	
Homocystenuria	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Methionine : 18,98
	φ.τ. (Methionine < 100)	
HyperMethioninemia	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Methionine : 18,98
	φ.τ. (Methionine < 100)	
Hyperammonemia, Hyperornithinemia, Homocitrullinemia Syndrome (HHH)	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Ornithine : 99,12
	φ.τ. (Ornithine < 160)	
Hyperornithinemia with Gyral Atrophy of the Choroid and Retina	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Ornithine : 99,12
	φ.τ. (Ornithine < 160)	
Maple Syrup Urine Disease (MSUD)	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Leucine : 136,80
	φ.τ. (Leucine/Isoleucine<305)	
Transient neonatal Tyrosinemia	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Tyrosine : 53,91
	φ.τ. (Tyrosine <360)	
Tyrosinemia Type I	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Tyrosine : 53,91
	φ.τ. (Tyrosine <360)	
Tyrosinemia Type II	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Tyrosine : 53,91
	φ.τ. (Tyrosine <360)	
Tyrosinemia Type III	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	Tyrosine : 53,91
	φ.τ. (Tyrosine <360)	
Phenylketonuria	ΘΕΤΙΚΟ	Phenylalanin: 395,18
	φ.τ. (Phenylalanine <134)	

ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ (β-ΟΞΕΙΔΩΣΗ)

ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟ ΝΟΣΗΜΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ	ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ (μΜ)
Medium Chain Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C6 : 0,08
		C8 : 0,05
		C10:1 : 0,06
	φ.τ. (C6<0.3, C8<0.5, C10:1<0.4, C8/C10<10)	C8/C10 : 0,73
Long Chain 3 Hydroxyacyl CoA Dehydrogenase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C16OH : 0,01
		C18:1OH : 0,01
		C18:2OH : 0,02
	φ.τ. (C16OH<0.1, C18:1OH<0.1, C18:2OH<0.1, C16:1OH<0.1)	C16:1OH : 0,04
Trifunctional Protein Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C16OH : 0,01
		C18:1OH : 0,01
		C18:2OH : 0,02
	φ.τ. (C16OH < 0.1, C18:1OH < 0.1, C18:2OH < 0.1, C16:1OH < 0.1)	C16:1OH : 0,04
Very Long Chain Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C14 : 0,07
		C14:1 : 0,08
		C14:2 : 0,04
		C16:1 : 0,04
	φ.τ. (C14 < 0.8, C14:1 < 0.6, C14:2 < 0.18, C16:1 < 1.04, C14:1/C16 < 0.25)	C14:1/C16 : 0,14
Short Chain Acyl CoA Dehydrogenase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C4 : 0,14
		C4/C2 : 0,01
	φ.τ. (C4 < 1.2, C4/C2 < 0.08, C4/C3 < 0.91)	C4/C3 : 0,09
Carnitine Palmitoyltransferase Deficiency Type I	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C0 : 29,80
		C16 : 0,54
	φ.τ. (C0:7 - 89, C16:0.59 - 12.7, C18:0.19 - 2.6)	C18 : 0,66
Carnitine Palmitoyltransferase Deficiency Type II	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C16 : 0,54
		C18:1 : 1,39
	φ.τ. (C16 < 8.7, C18:1 < 2.8, C18:2 < 0.9)	C18:2 : 0,41
Glutaryl CoA Dehydrogenase Deficiency Type II	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C4 : 0,14
		C5 : 0,12
		C6 : 0,08
		C8 : 0,05
		C10 : 0,07
	φ.τ. (C4 < 1.2, C5 < 0.44, C6 < 0.3, C8 < 0.5, C10 < 0.34, C5/C3 < 0.5)	C5/C3 : 0,08
2,4 Dienoyl CoA Reductase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C10:2 : 0,03
	φ.τ. (C10:2 < 0.12)	
Carnitine/AcylCarnitine Translocase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C16DC : 0,01
	φ.τ. (C16DC < 0.32)	
Carnitine Uptake Defect	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C0 : 29,80
	Free Carnitine > 3.8	
Short Chain HydroxyAcyl Coa Dehydrogenase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C4OH : 0,07
	φ.τ. (C4OH < 0.48, C16OH < 0.1)	C16OH : 0,01
Medium Chain 3-Ketoacyl Coa Thiolase Deficiency	ΑΠΝΗΤΙΚΟ	C3DC/C4OH : 0,22
		C6DC : 0,03
		C8DC : 0,02
	φ.τ. (C3DC/C4OH < 0.48, C6DC < 0.2, C8DC < 0.1)	

LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων



LC-MS και Νεογνικός Έλεγχος Μεταβολικών Νοσημάτων

ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΟΧΗ ΣΑΣ

