

TOXICOLOGISCHE SCREENING M.B.V. LC-MS/MS

Yuma Bijleveld (AMC)

Tessa Bosch (Maasstad)

Marloes van der Meer (AMC)

Eugenie Schrama (Maasstad)

Wie overweegt het bepalen van toxicologie m.b.v. LC-MS/MS ??

- Waarom niet bij HPLC (o.a. STIP) blijven?
- Wat zijn de voor/nadelen LC-MS/MS t.o.v. HPLC (o.a. STIP)

Inleiding

- Waarom overstappen naar LC-MS/MS
- Hoe werkt LC-MS/MS
- De LC-MS/MS bibliotheek
- Monstervoorbewerking
- Validatie
- Kwalificatie van de medewerkers
- Wat verwacht de analist van de apo?
- Wat kan de Apotheker van ons verwachten?
- Voorbeeld Casus

Waarom overstappen?

AMC:

- Empower 3 (Windows 7)
- LC-MS/MS: gevoeliger, specifiek
- HPLC (STIP): Robuuster
- STIP meet alleen toxische spiegels, LC-MS/MS meet ook therapeutische spiegels
- Opwerking vereenvoudigd

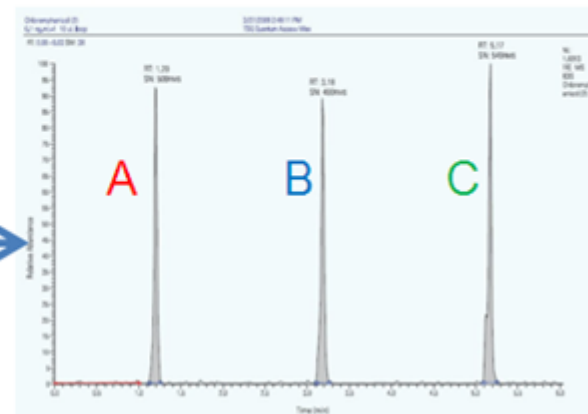
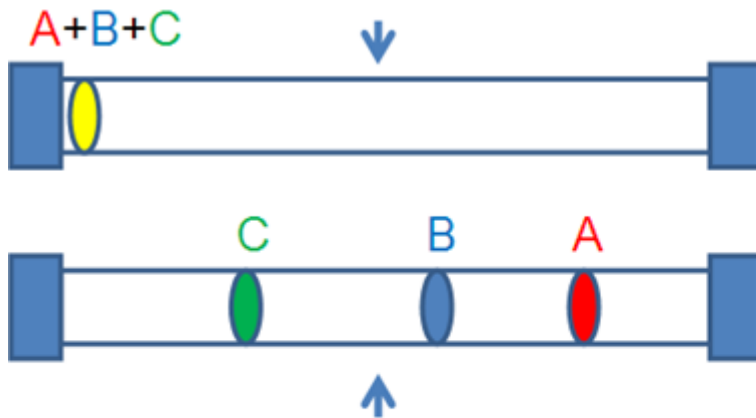
Waarom overstappen?

Maasstad:

- Snellere analyse
- Groeiend systeem (STIP eindig)
- STIP op windows XP
- LCMSMS specifiek dan UV van STIP
- Minder monster nodig

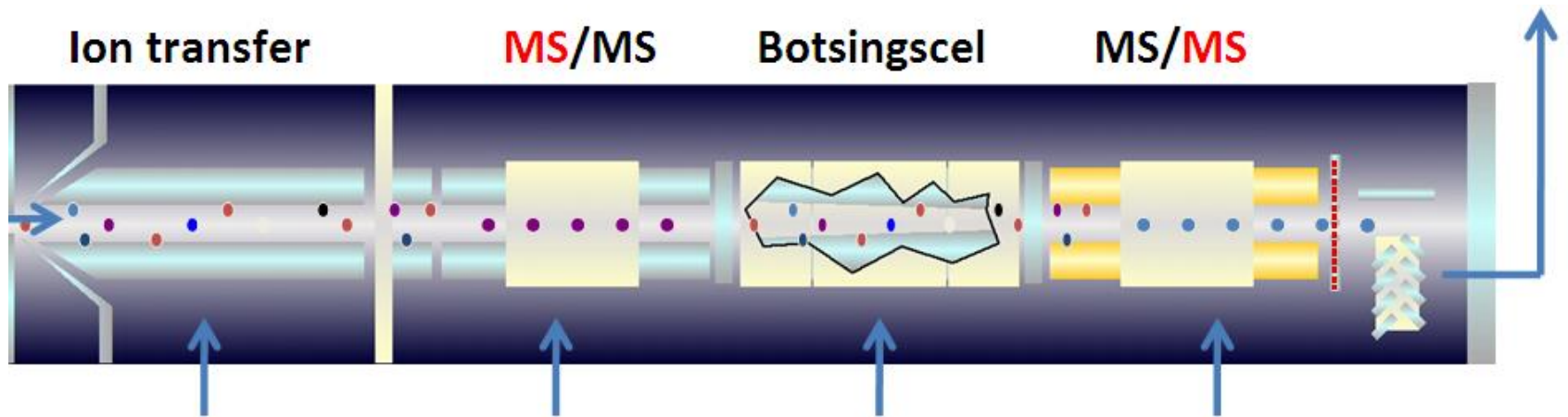
Hoe werkt LC-MS/MS

□ LC



Hoe werkt LC-MS/MS

□ MS



De LC-MS/MS bibliotheek

- AMC: I-method aangeschaft via Absciex

iMethod™ Test for Cliquid® Software

Analyte	Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	DP (V)	CE (eV)	Agilent RT (min)	Shimadzu RT (min)
Butaperazine	410.2	141.1	40	35	10.30	9.68
Caffeine	195.1	122.9	40	50	1.79	1.54
Carazolol	299.2	116.1	40	20	6.66	6.07
Carbamazepine	237.1	193.1	40	50	4.07	3.51
Carbinoxamine	291.1	202.1	40	35	7.37	6.80
Carbuterol	268.2	194.1	40	20	2.14	1.86
Carteolol	293.2	122.1	40	50	3.58	3.05
Carvedilol	407.2	222.2	40	20	8.24	7.65
Celiprolol	380.2	251.2	40	20	5.47	5.02
Cetirizine	389.2	201.1	40	20	7.44	6.84

De LC-MS/MS bibliotheek

- Maasstad:
- UMCU heeft bibliotheek ontwikkeld op basis van ThermoScientific

**Application
Note: 536**

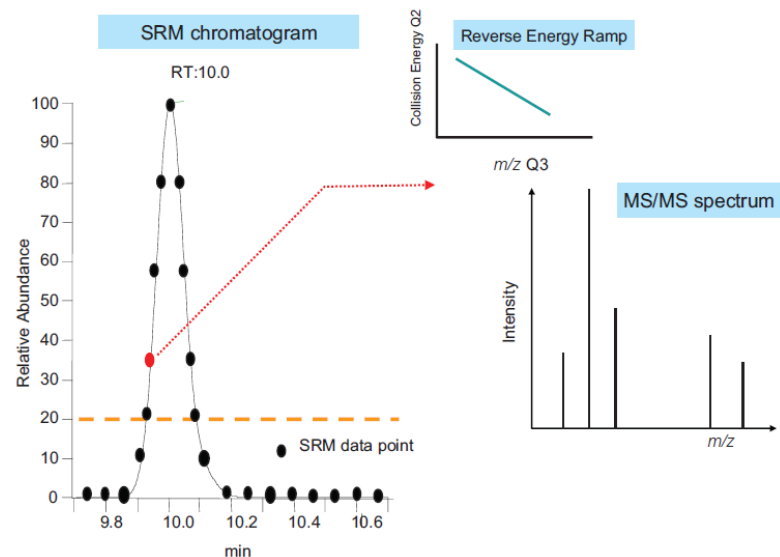
Targeted Screening of Drugs of Abuse and Toxic Compounds with LC-MS/MS Using Triple Stage Quadrupole Technology

*C. Gechtman, A. Masarin, A.O. Ospedale Niguarda Cà Granda, Milano, Italy
S. Scurati, Thermo Fisher Scientific, Milano, Italy
B. Duret, P. Regulus, Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France
For Forensic Toxicology Use Only.*

- Ca. 280 componenten geselecteerd door ZAPO UMCU

Theorie LC-MS/MS bibliotheek thermo

- Iedere component heeft 1 overgang in een retentie window met een ingestelde absorbance drempel
- Als deze drempel wordt gehaald, dan volgt er een full scan spectrum in Q3



De LC-MS/MS bibliotheek

Hoe kunnen wij nu bepalen of een bibliotheek voldoet/niet voldoet??



De LC-MS/MS bibliotheek

AMC:

- Bibliotheek vergeleken met STIP bibliotheek
 - ▣ Deels Amerikaanse middelen
 - ▣ 28 middelen niet aanwezig
 - ▣ 10 middelen niet relevant (niet in NL in de handel oid.)
 - ▣ Van de 18 overgebleven middelen 10 in front STIP
- Er zitten nog endogene stoffen in de huidige bibliotheek (bijv. epinefrine)
- Momenteel 1 methode met 300 componenten

De LC-MS/MS bibliotheek

Maasstad/Thermo:

- LC-MS/MS bibliotheek geselecteerd door UMCU op basis van NL praktijk en STIP
- Bekend dat sommige stoffen er niet in zitten; zoals ibuprofen, digoxine, valproïnezuur, propofol
- Geen endogene stoffen

Monstervoorbewerking

□ AMC: eiwitprecipitatie

□ Maasstad:

- Fosfolipiden verwijderen
- 3 interne standaarden toevoegen (RT verspreid) (caffeine-³C13, haloperidol-d4 en amiodaron-d4)

Stelling

De bibliotheek is vastgesteld

Hoe nu verder?



- A. Direct in gebruik nemen, methode draait ergens anders toch ook al?
- B. Eerst valideren, geen enkel systeem werkt altijd hetzelfde

Validatie

AMC:

- Gevalideerd door ABsciex voor aanschaf
- Stockoplossingen geïnjecteerd
- Ondergrens vastgesteld (i.v.m. vals positieve uitslagen)
- Kwalitatief (geen precisie, juistheid, lineariteit, etc bepaald)!
- Serum (geen urine)

Validatie

- Maasstad:
- Testoplossingen(=IS) geïnjecteerd
- Andere RT's
- Flow aangepast
- SST met meerdere componenten (zuur, basisch, neutraal)
- Carry-over
- KKG T Tox-en en patiëntenmonsters STIP vergelijken

Vraag

Hoe kan deze methode geïmplementeerd worden op de werkvloer?

Kan elke analist zomaar met dit systeem werken?

Kwalificatie van de analisten

AMC/Maasstad:

- 4 resultaten van 'test' patiënten uitwerken en beoordelen
- Zelfstandig monsters kunnen inzetten + uitwerken en beoordelen
- Analisten die dienst doen zijn voor de dienst gekwalificeerd

Stelling

Verandert er iets voor de apothekers?

- A. Nee, ze snappen het sowieso niet
- B. Ja, de hele wereld verandert
- C. Ja, de interpretatie wordt ingewikkelder



Taak zapo bij aanvraag tox?

- Kritisch zijn op inzetten LC-MS/MS tox
 - Anamnese
 - Goed uitvragen (thuis)medicatie!
 - Toxidroom / klinisch beeld

Taak zapo naar analist

Bij aanname:

- Thuismedicatie noemen
- Vermoeden van ingenomen middel uitspreken

Na uitslag:

- Kritisch bekijken van de resultaten (ook therapeutische spiegels worden gevonden)
- Verbanden leggen tussen gevonden middelen en klinisch beeld

Taken analist naar zapo

- Veel wordt gevonden (ook thuismedicatie, evt endogene stoffen)
- Geen alcoholen
- Kwalitatief → geen uitspraak over kwantiteit
- Semi-kwantitatief evt mogelijk met opwerken standaard
- Kwantificeren alleen met andere gevalideerde methode

Positieve punten

- Snelle monster opwerking
- Minder monster
- Korte runtijd
- Lage detectie limieten
- Hoge selectiviteit door full MS2 spectra (Thermo)

Negatieve punten

- Alleen componenten die in bibliotheek staan worden gevonden
- Geen screening van onbekenden mogelijk
- Lage detectie grens, je ziet alles
- Vergt veel kennis van analisten/ZAPO

Casus

- Patiënt H., 12 jr. (v), enige tijd opgenomen
- Verdinking drinken flacon handen alcohol o.i.d.
- Onbegrepen beeld, afwijkende ademhaling, geen direct verklaring te vinden → hogere alcoholen?
- Contact met apotheek graag algemene toxicologische + alcoholen screening
- Paar dagen voor contact met apotheek is melding naar kinderplichtverlening uitgegaan i.v.m. verdinking op Munchhausen by proxy door moeder
- Veel onbegrepen opnames in voorgeschiedenis zonder verklaring

Analyse

- LC-MS/MS tox screening ingezet
- GC-FID screening ingezet

- Resultaten:
 - Duidelijke piek bij aceton en alcohol uit GC-FID screening (bloed)
 - Duidelijke piek MDMA (urine), amfetamine (bloed + urine) uit LC-MS/MS screening

Rapportage

- Resultaat amfetamines onverwacht, dus urine screening m.b.v. immunoassay (Cobas): negatief (<1000 µg/l)
- Schatting [aceton] o.b.v. testmengsel: ca. 250 mg/L
- Rapportage:
 - ▣ Aceton toxisch (ref: 200-400 mg/L)
 - ▣ Amfetamines aantoonbaar

Gevolg patiënt/kliniek

- O.b.v. resultaten is actie ondernomen → moeder gescheiden van kind
- Inschakelen van vertrouwensarts en medische directie
- Vraag vanuit kliniek: welke zekerheid aantoonbaarheid?
- Klinische vraagstelling is forensische vraag geworden

Vervolg lab (dag 2)

- Kwantificeren alcoholen op dag 2:
 - Blijkt rekenfout door 1^e analist
 - Aceton ca. 6 mg/l, ethanol 35 mg/l
- Kritische blik amfetamines:
 - Signaal MS duidelijk boven afkapwaarde
 - Geen grondstof voor kwantificering
 - Signaal Cobas ca. 200 µg/l
 - Vergelijkbaar signaal vanuit amfetamine kit Cobas

Vervolg rapportage

- Communicatie over gevonden resultaten
- Grote mate van zekerheid maar geen 100% over de amfetamines door 2 verschillende technieken
- 100% zekerheid door bevestigingsonderzoek
- Geen grondstoffen in apotheek om uit te voeren
- Nog klinisch relevant?
- Melden fout behandelend artsen + medische directie

NFI en verder

- Onderzoek naar de monsters:
 - Geen aantoonbare stoffen
 - Gevalideerde bevestigingsmethode
 - Onduidelijk welke gehanteerde afkapwaarde

- Vervolg
 - Monsters opvragen via OM
 - Bevestigingsonderzoek door UMCG
 - Zelf vervolgonderzoek d.m.v. standaarden

Leerpunten

- Screening geeft aanwijzing
- Zekerheid d.m.v. gevalideerde bepaling
- Ervaring van andere ziekenhuizen
- Andere systemen, zoals ToxID Bruker, Waters enz



Wie overweegt het bepalen van
toxicologie m.b.v. LC-MS/MS ??

Vragen

Zijn er nog vragen ??

