

Etat des lieux national Dosage des acides aminés « LC/MS-MS »

Réunion SFEIM qualité
Paris 04/12/2017

Dr. C. Homedan
Laboratoire de Biochimie
CHU Angers

Les centres utilisant une technique LC/MS-MS en diagnostic



Expériences



**Piraud M et al.
2005**

Centre	Angers	Amiens	Paris RDB	Lille	Tours	Montpellier	Paris A. Trousseau	Paris Necker	Lyon
Matériel	LC-MS/MS								
Marque équipement	Agilent 1100/Sciex Api 3000	Waters - Xevo/TQD	UPLC Iclass-TQD (Waters)	Shimadzu /SCIEX	Waters Xevo Aquity TQD	Waters Xevo-TQD	Thermo TSQ Endura couplé à Dionex Ultimate 3000	Waters	ABSCIEX
Kit commercial (nom)	Maison	Maison	Maison	aTRAQ Kit Physiological 200 Assay	Adaptation kit zyvak aminoacids	Maison	Maison	AccQTag	NR
Durée de préparation	2h30/série	<20'	30'	2 h/série	10'	1 h 15/ série	45'	1h (15 min de dérivation)	15'
Précipitation des prot	méthanol	méthanol	Acide sulfo 30%	Acide sulfo 10%	Acide sulfo 30%	Acide sulfo	Acide sulfo 30%	Acide sulfo	Méthanol (+ contrôle S-2-Aminoéthyl-Cysteine)
Dérivation	Non	Non	HCl/Butanol	Ajout d'un groupement (Marquage) réactif avec les Fonctions Amine Primaire et secondaire.	dérivation du kit zyvak propylchloro formate ?	Non	Non	Oui	Non

Phase analytique 1

Centre	Angers	Amiens	Paris RDB	Lille	Tours	Montpellier	Paris A. Trousseau	Paris Necker	Lyon
Nombre d'étalon internes	3 Augmentation en cours	21	23	pour chaque Acide Aminé + Norleucine	12	9	17	28	21
Volume de prise d'essai	100 µl (possible 50)	20 µl	50 µl de plasma	40 µl	50 µl	10 µl		40 µl	100µl
Dilution de l'échantillon dans la phase de préparation	Pur plasma et LCR U selon creat	1/50 ème	1/50 ème	Pur	1/2	1/100ème	1/10 ème	Dilution dans l'eau	1/2
Phase LC	Inverse							C18, elution eau/ACN et acide formique 0,1%	
Paire d'ion	Oui	Oui	Non	Non	Oui	Oui	non	Non	oui
Durée du run	30'	40'	12'	18'	35'	30'	30'	10'	32'
Volume injecté	5 µl	10 µl	1 µl	2 µl	10 µl	10 µl	4 µl	5µl	5µl
Séparation Aile/Ile/Leu	Bonne							Rendement selon l'âge de la colonne	

Phase analytique 2

Centre	Angers	Amiens	RDB Paris	Lille	Tours	Montpellier	Paris A. Trousseau	Paris Necker	Lyon
Nombre d'AA quantifiés	16-45								
Nombre d'AA identifiés et/ou semi-quantifiés	6-38								
Robustesse (Rt, Colonne, opérateur, pH...)	Très bonne								
Origine calibrateur	Sigma	Recip+ Sigma	Recip	Sigma	Sigma	Sigma	Std geol et poudre	Sigma	Sigma adapté (+ Asn, Gly, Gln)
Nombre / niveau d'étalonnage	calibration (acide-neutre et basique) dilués pour faire 6 points de gamme	1	2 points patho/physio bas	1/ Point 250 µM	?	7 points	4-8	6+ 0	3

Phase analytique 3

Centre	Angers	Amiens	Paris RDB	Lille	Tours	Montpellier	Paris Necker	Lyon
CIQ	Clincheck	Recip + sigma	Recip + pool maison	ERNDIM	Recipe ClinCheck level 2 avec dilutions en cascade (pur, 3/4, 1/2, 1/4, 1/8)	2 CTL	4 Maison pour AA rares	NR
Niveaux	2 niveaux	2 niveaux (1 seul pour cystine)	2 niveaux	2 niveaux	plusieurs	2 niveaux	NR	2
CV moyens AA avec EI	6-10						NR	9
CV moyens AA sans EI	9-12						NR	12
% d'AA du CIQ avec CV <5%	0-17 (médiane 5%)						NR	13% niveau H 17% niveau B
% d'AA du CIQ avec CV compris entre 5 et 10%	75-86 %						NR	54% niveau H 50% niveau B
% des AA du CIQ entre 10-15%	0-20 % (médiane 12%)						NR	33% niveau H 21% niveau B
% et nature des AA du CIQ avec CV >15%	0-5% AA						NR	0% niveau H 12% niveau B (Asn, Asp, Glu)

Difficultés

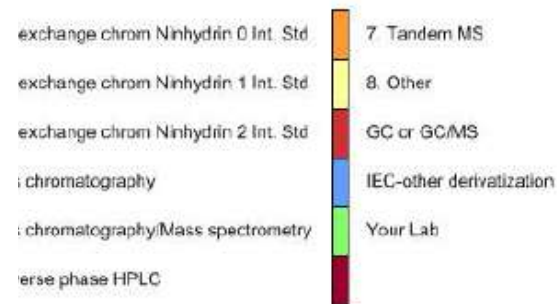
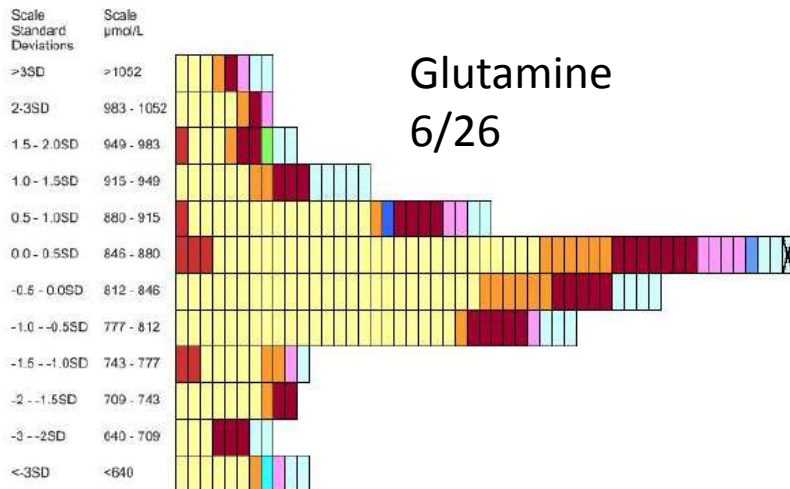
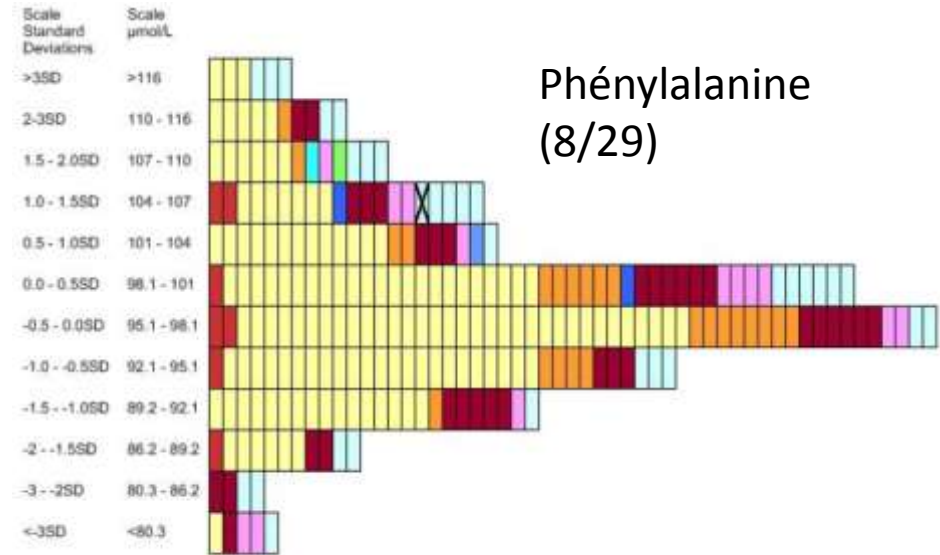
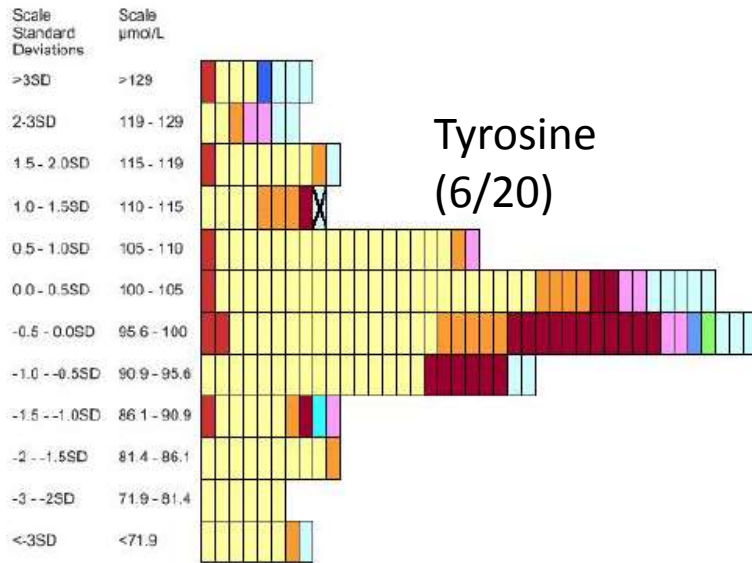
- Difficultés de rendre les examens urgents



Difficultés

- Problème de quantification de certains AA : (cystine-ASN<ASP, GLN<GLC, SARC-Ala, ASP en valeur basse)
- CIQ Citrulline > 15 % pour un des centre
- Problèmes liés au vieillissement de la colonne
- Interférence : Pipécolique
- **Lyon** : la durée de vie de la colonne est limitée, encrassement de la source
 - signal dans le blanc pour certains AA (lié ou non à l'EI)
- **Necker** :
 - Problème UPLC Classe, informatique compliqué.
 - Kit de dérivation de manipulation aisée, robuste, permettant un run très rapide en UPLC, mais ayant une sensibilité médiocre pour certains acides aminés et pour les transitions spécifiques, ce qui est problématique pour les Triple Quad de niveau moyen de gamme.

Contrôle de qualité externe ERNDIM



25 à 30% >+/- 2SD

Conclusion

- Malgré une technique assez similaire, il existe de différences dans les détails
- Technique robuste
- Cout de consommable modéré en dehors des kits mais cout de machine élevé.
-