



## TIBBİ LABORATUVARLARDA KULLANILAN ELİSA VE LC-MS CİHAZLARININ ANALİZ ÖLÇÜMLERİ ÜZERİNDEN KARŞILAŞTIRILMASI

Sevilay İNAL KABALA<sup>1</sup>, Saffet ÇELİK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tıbbi Laboratuvar Programı, Kırklareli Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Kırklareli, Türkiye

<sup>2</sup>Teknoloji Araştırma ve Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye

### Öz

Klinik numunelerde yapılan kalitatif ve kantitatif tayinlerin hastaların sağlığı açısından kritik bir öneme sahip olduğu bilinmektedir. Klinik analizlerin gerçekleştirildiği cihazların performans ve kaliteleri, sonuçların doğruluğunu etkilemektedir. Hastalığın tanısının konması ve tedavide doz ayarının yapılabilmesi gibi önemli kararların alınabilmesi, cihazların performansına bağlıdır. Bu çalışmada klinik uygulamalar arasından toksikolojik analiz, steroid hormon ölçümü, tam kanda takrolimus seviyesi ve idrarda bisfenol A analizleri için ELİSA (enzim bağlı immunosorbent analizi) ve LC-MS (sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi) tekniği karşılaştırılmış ve analiz seçimini nasıl etkilediği araştırılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** ELİSA, LC-MS, toksikoloji, steroid hormon, LC-MS/MS, LC-QTOF

## COMPARISON OF ELISA AND LC-MS DEVICES USED IN MEDICAL LABORATORIES OVER ANALYSIS MEASUREMENTS

### Abstract

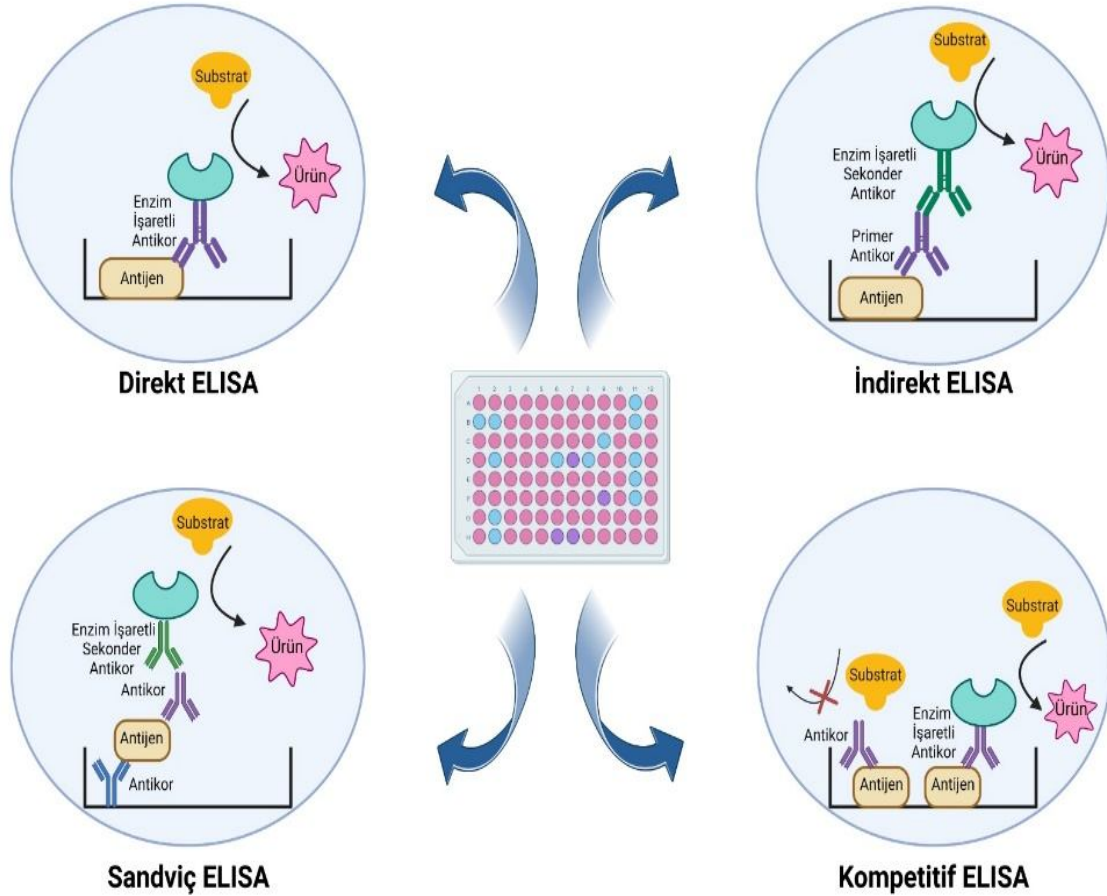
It is known that qualitative and quantitative determinations made in clinical samples have a importance for the health of patients. The performance and quality of the devices on which clinical analyzes are performed affect the accuracy of the results. Making very important decisions, such as diagnosing the disease and adjusting the dose in treatment, depends on the performance of the devices. In this study, ELISA (enzyme-linked immunosorbent analysis) and LC-MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry) techniques for toxicological analysis, steroid hormone measurement, whole blood tacrolimus level and urine bisphenol A analyzes were compared among clinical applications and how they affect the analysis selection was investigated.

**Keywords:** ELISA, LC-MS, toxicology, steroid hormone, LC-MS/MS, LC-QTOF

Sorumlu Yazar: Sevilay İNAL KABALA, sevilay.inal@klu.edu.tr

## 1. Giriş

Hastalıkların tanısının konulması, tedavi takip sürecinde alınan numunelerdeki biyobelirteçlerin varlığını-düzeyini ölçmek ve doğrulama ölçümlerini gerçekleştirmek için birtakım teknolojiler kullanılır. Bu teknolojiler aynı zamanda tedavi sırasında verilecek ilaç dozaj tespiti ve ne zaman verileceğini belirlemek amacıyla da kullanılır. İşlem süresi kısa olan, düşük maliyete sahip, yüksek verimde ve daha doğru sonuçlar veren teknolojiler tercih edilmektedir. Günümüzde tıbbi laboratuvarlarda bu amaçlar doğrultusunda sıklıkla tercih edilen cihazlar immünoanaliz türü olan ELİSA (enzim bağlı immunosorbent analizi) cihazlarıdır. ELİSA, antijen ile antikor arasındaki reaksiyondan köken alarak antikora bağlı enzimin aktivitesini araştırmaya dayalı ölçüm tekniğidir [1-2]. ELİSA dört çeşit varyasyona sahip immünolojik testtir (Şekil1).



**Şekil 1.** ELİSA Yönteminin Çeşitleri

ELİSA'da antikor aranacaksa mikropilaka yüzeylerine antikora spesifik antijen bağlanmalı, antijen aranacaksa mikropilaka yüzeylerine antijene spesifik antikor bağlanmalıdır.

#### Direkt ELİSA:

- Antijen barındıran numunenin inkübasyonu ile mikropilaka yüzeyine adsorbsiyonu gerçekleşir.
- İkinci basamakta enzim bağlı (işaretli) antikorun antijene tutunması sağlanır ve bir süre inkübe edilir.
- Yıkama işlemi uygulanarak bağlanmayan işaretli antikorların ortamdan uzaklaştırılması sağlanır.
- Son adımda enzimin substratının eklenmesiyle renkli bileşen (ürün) oluşur ve spektrofotometreyle ölçümü gerçekleştirilir.

#### İndirekt ELİSA:

- Antijen barındıran numunenin inkübasyonu ile mikropilaka yüzeyine adsorbsiyonu gerçekleşir.
- Ortama işaretsiz primer antikorlar eklenerek antijene tutunması sağlanır.
- Yıkama işlemi gerçekleştirilerek bağlanmayan fazlalık antikorlar uzaklaştırılır.
- Primer antikorlara özgü enzim bağlı sekonder antikor ilavesi yapılır ve bir süre inkübe edilir.
- İkinci bir yıkama işlemi yapılarak sekonder antikor fazlalıkları ortamdan uzaklaştırılır.
- Ortama enzim substratının eklenmesiyle oluşan renkli bileşen oluşur ve spektrofotometreyle ölçümü gerçekleştirilir.

#### Sandviç ELİSA:

- Direkt veya indirekt olarak uygulanabilir.
- Mikropilaka yüzeyine antikorların sabitleştirilmesiyle (immobilizasyon) işlem başlatılır.
- Antijen barındıran numunenin inkübasyonu ile antijen-antikor kompleksi oluşması beklenir.
- Yıkama işlemi gerçekleştirilerek bağlanmayan fazlalık antijenler uzaklaştırılır.
- Enzim işaretli bir diğer antikor ortama tatbik edilerek antijenin farklı bir epitobundan bağlanması beklenir.

- Yıkama işlemi gerçekleştirilerek bağlanmayan işaretli antikorlar ortamdaki uzaklaştırılır.
- Ortama enzim substratının eklenmesiyle oluşan renkli bileşen oluşur ve spektrofotometreyle ölçümü gerçekleştirilir.

#### Kompetitif ELİSA:

- Mikroplaka yüzeyine antijen veya antikorların bağlanmasıyla işlem başlatılır.
- Mikroplaka üzerine işaretli ve işaretli olmayan ligantlar (antijen/antikor) eklenir ve inkübe edilir.
- İnkübasyon süresi içerisinde işaretli ve işaretli olmayan ligantlar antijen veya antikora bağlanmak için yarışır.
- Yıkama işlemi ile ortamdaki bağlanmamış olan ligantlar uzaklaştırılır.
- Ortama enzim substratının eklenmesiyle oluşan renkli bileşen oluşur ve spektrofotometreyle ölçümü gerçekleştirilir.
- Renkli bileşen oranı işaretli ligant miktarıyla (işaretli ligant ile substrat reaksiyon verip renkli bileşen oluşturacağından) doğru orantılı, işaretsiz ligant miktarıyla ters orantılıdır.

#### ELİSA'nın güçlü yönleri:

- Testler için ticari firmalar tarafından tedarik edilen kitler sayesinde kullanım kolaylığı içermektedir. Bu sayede personeli sürekli eğitime zorunluluğu ortadan kalkar.
- Temelde ekipman maliyetleri makul seviyededir. Otomasyonu geliştirmeye yönelik eklemeler yapılması maliyeti arttırır.
- Sinyal güçlendiricilerle birleştirildiği takdirde yüksek seviyede duyarlılığa sahip olurlar.
- Geniş bir uygulama alanına sahip olduğu için ELİSA'da testlerin doğrulanması ve amaca uygun olarak kabul edilmesinde muhtemel sorunları gidermeye yardımcı olacak performansa sahiptir.
- Birden fazla numuneyi aynı anda değerlendirme yeteneğinden dolayı kısmen yüksek verim sağlar [3].

#### ELİSA'nın sınırlamaları:

- Çok seçici antikorları üretmenin zorluğundan dolayı seçicilikte sınırlamalara neden olabilir. Konfigürasyondaki en ufak bir değişikliğin ligantların bağlanmasında sorun yaratabilir.

- Antikorların izoform yapıları veya post translasyon modifikasyonları söz konusu olduğunda antijenlerde oluşan farklılıklardan dolayı analit tespitini tam olarak yapamayabilir [4].
- Komplike sürece sahip antikorlardan kaynaklı özellikle testler arasında değişkenlik farklı oranlarda sapmalara neden olmaktadır. Bu da tekrarlanabilirliği olumsuz şekilde etkilemektedir.
- ELİSA ölçümlerinde kullanılan reaktif maliyeti ve günlük çalıştırma maliyetleri göz önüne alındığında numune başına maliyeti çok fazla arttırmaktadır.
- Test ölçümlerinde yer alan basamaklardan (inkübasyon, yıkama) kaynaklı test süresinin uzaması ELİSA'nın sınırlamaları arasındadır.

LC-MS (sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi); HPLC (yüksek performans sıvı kromatografisi) ve MS (kütle spektrometresi) teknolojilerinin birlikte çalıştırılarak kalitatif ve kantitatif tayinlerinde kullanılan cihazlardır [5]. LC-MS'in çalışma prensibi;

- Numunelerdeki biyobileşenlerin fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılması (her bir biyobileşenin sabit faza farklı afinitelerde bağlanmasına bağlı olarak ayrıştırılması esasına dayanır),
- İyonizasyon işleminin uygulanması ile moleküllerin iyon haline dönüştürülmesi,
- İyonların kütle/yük oranına göre ayrılması [6],
- Azot gazıyla parçalama işlemi,
- Parçalanma sonucu oluşan iyonların doğrudan kütle ölçümü, TOF (uçuş zamanlı) veya QTOF (kuadrupol uçuş zamanlı) gibi çok hassas ve güçlü araçlar kullanılarak kalitatif ve kantitatif tayinlerinin yapılmasını içermektedir.

LC-MS bu sayede karmaşık numunelerde herhangi bir ön işlem yapılmadan analize izin verir [7]. Eser miktarda bileşenlerin tespiti, hormonların, toksik maddelerin, metabolitlerin, proteinlerin karakterizasyonunda kullanılır.

LC-MS'in güçlü yönleri:

- Hassas numune ekstraksiyonu ve kromatografi uygulama işleminin titizlikle yapılması sağlanırsa çok düşük konsantrasyonlarda (pikomol) analiz yapabilir.

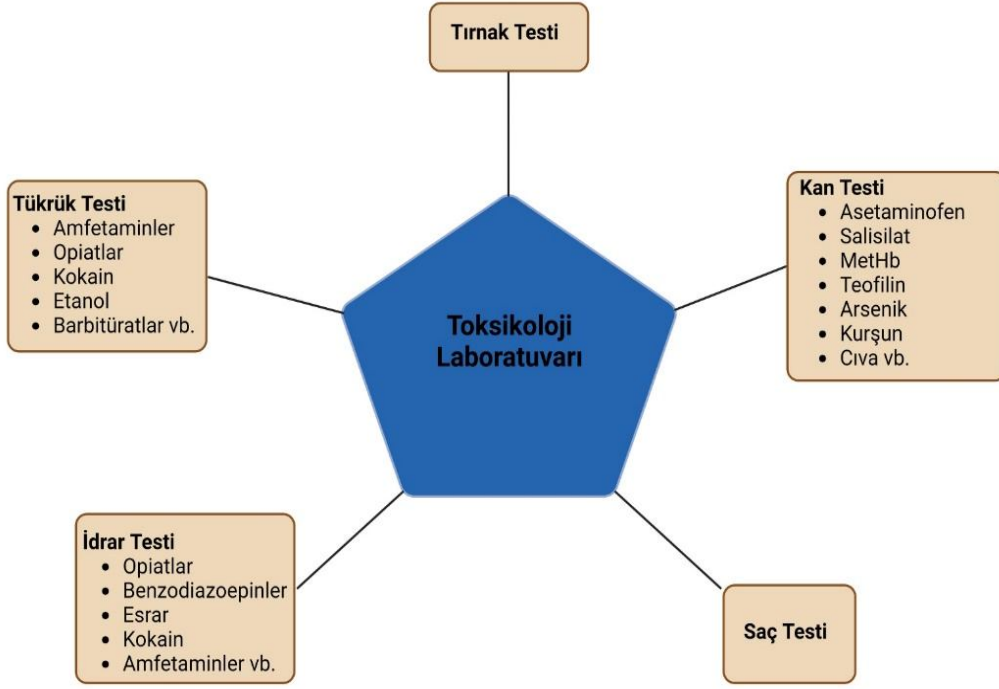
- Yüksek numune hacimlerinin alınması mümkün olmayan durumlarda bile çok düşük numune miktarları analizi gerçekleştirilmeye yeterli olmaktadır.
- Yapı olarak birbirine benzer moleküllerin ayrımını yapan yüksek seçiciliğe sahip cihazlardır.
- Kullanılan kolon ve çözücüler dikkate alındığında numune başına düşen maliyet oldukça düşüktür.
- HPLC'nin tutma süresindeki hassasiyete bağlı olarak testler arasında standart sapmalar çok düşük olmaktadır. Bu da tekrarlanabilirliğin yüksek olduğunu gösterir.
- HPLC'nin yüksek hızda biyomolekülleri ayırması, MS'in de eş zamanlı olarak analiz yapması zamandan tasarruf sağlamasını mümkün hale getirir.
- LC-MS'te iyonize edilebilen bütün bileşenlerin analizi gerçekleştirilebilir.
- Aynı anda birçok analitin analizi gerçekleştirilebilir.

LC-MS'in sınırlamaları:

- MS'in çalışma işlemi ve yorumlama basamağı karmaşık olduğundan eğitimli personel ihtiyacı doğar. Buna bağlı olarak eğitime de yatırım yapılması söz konusu olacaktır.
- Ekipmanın maliyeti ve bakım masrafları oldukça yüksektir.
- Numunelerin karmaşıklığı (özellikle proteinlerde) dikkate alındığında MS öncesinde HPLC'de iyi bir ayırım yapabilmek için enzimatik olarak peptitlere parçalanma işleminin yapılması gerekir. MS peptitlere karşı daha hassastır. Enzimatik süreçte proteinlerin peptitlere dönüşümü MS'in hassasiyetini değiştirebilir.

Kütle spektroskopi sistemleri ve ELISA yöntemi aynı veya benzer analizlere uygulanmakta ve paralel sonuçlar elde edilmektedir. Ancak bu iki analiz sistemin birbirlerine karşı birtakım avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Rutin laboratuvarlarda uygulanan bazı analizlerin bu iki cihaz ile yapılması ve elde edilen sonuçların değerlendirilmesi aşağıdaki gibidir.

Metabolizmaya zarar veren her türlü madde (kimyasal, radyoaktif, biyokimyasal) toksikoloji laboratuvarında tayin edilir. Özellikle yasadışı ve kötüye kullanılan ilaç ve madde analizinin gerçekleştirilmesinin yanı sıra madde bağımlılığının tespitinin yapıldığı önemli laboratuvarlardır [8].



**Şekil 2.** Toksikoloji Laboratuvarında Yapılan Testler

Son yıllarda özellikle uyarıcı madde kullanımının artmasına bağlı olarak, uyarıcı maddelerden türetilen ‘tasarım ilaçları’ gün geçtikçe artmaktadır. Bilinen maddelerde gerçekleştirilen küçük kimyasal modifikasyonlarla yapıları değiştirildiği için tespit edilmesi ve doğrulanmasında zorluklara neden olabilmektedir. Toksikoloji laboratuvarlarında genel olarak toksik maddelerin tespiti için ELİSA gibi immünolojik tarama yöntemleri kullanılır (Şekil 2). Ancak doğrulama için GC-MS, LC-MS/MS gibi tekniklerden yararlanılması gereklidir. Afyon veya türevlerinden izole edilen ve çeşitli kimyasal reaksiyonlar sonucunda türevlendirilen opiatlar biyoaktif moleküllerdir ve farklı etkilere sahiptirler. Geçmiş yıllarda anestezik ve ağrı kesici olarak kullanılmışlardır [9]. Halisünatif ve bağımlılık yapıcı etkilerinden dolayı günümüzde sadece bazı opiatlar tıbbi olarak kullanılmaktadır. Giderek artan uyuşturucu kullanımından dolayı toksikolojik analizlerde özellikle morfin ve türevleri çeşitli yöntemlerle insan kan, idrar ve saç örneklerinde taranmaktadır. Tam kanda opiatların ve böbrekte metabolize olması sonucu üretilen glukoronit türevlerinin (morfin, morfin glukoronit, kodein, kodein glukoronit, hidrokodon, hidromorfin, hidromorfin glukoronit,

oksikodon, oksimorfin ve oksimorfin glukoronit) analizi ELISA ve LC-QTOF sisteminde yapılmıştır [10]. Toplam 968 tam kan örneğinde yapılan analizler ve yapılan istatistiksel veriler kütle sistemlerinin daha düşük limitlerde analiz yapabildiğini ve ELISA sonuçlarında hatalı-pozitif veya hatalı-negatif sonuçlar üretebildiğini göstermiştir. ELISA yöntemi ile numunelerden 5 tanesinde hatalı-pozitif sonuç elde edilirken 2 tanesinde hatalı-negatif sonuç elde edilmiştir [10].

Steroidler kolesterol öncül bileşiklerdir. Steroid hormonlar sentezlendikleri bölgelerden, hedef organlarında yer alan reseptörlerine bağlanarak bir dizi metabolik reaksiyonu başlatırlar. Steroid hormonların sentezlenme veya salınımında yaşanan problemler, bir takım metabolik sorunlara yol açar. Vücudumuzda moleküler yapıdaki başlıca hormonlar steroid türevlidirler. Fizyolojik olayların düzenlenmesinde, metabolizmanın işleyişinde, bağışıklık sisteminde, hücrelerin doğru ve zamanlı çalışmasında önemli rol oynamaktadırlar [11]. Steroid hormonların analizi genelde immünojenik yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. Steroid türevli hormonlardan olan androstendione karşılaştırmalı olarak RIA (Radioimmunoassay), ELISA ve kütle kromatografisi sistemi ile serum numunelerinde analiz edilmiştir. Yeni geliştirilen LC-MS/MS metodunun verifikasyonu ve validasyonu yapılmış, diğer metotlara göre üstünlüğü istatistiksel olarak verilmiştir [12]. Yapılan analizler neticesinde en fazla hatalı girişimin ELISA yönteminde olduğu ve bu nedenle LC-MS/MS ve RIA'ya göre androstendione konsantrasyonlarının daha yüksek bulunduğu belirtilmiştir [12].

Organ nakli olan kişilerde, organın vücuda uyum sağlama sürecinde bağışıklık sistemi baskılayıcı ilaçlar verilmektedir ve bu ilaçların en yaygın kullanılanı takrolimustur. Böbrek ve karaciğer nakli olmuş hastalarda takrolimus konsantrasyonunun başlangıçta 12 saatte bir kontrol edilmesi gerekmektedir [13]. İlerleyen süreçte haftada bir ve ayda bir ölçüm yapılmaktadır ve bu periyodik ölçüm 2-3 yıl kadar sürmektedir. Böbrek ve karaciğer nakli olmuş hastalarda takrolimus seviyesi ölçümleri ELISA ve kütle spektroskopisi ile yapılmış, hatalı sonuç aralığı ve girişim kaynaklı konsantrasyon farklılıkları belirlenmiştir [14]. Elde veriler değerlendirildiğinde ELISA sonuçlarında %3-13'lük bir standart sapmaya sebep olduğu görülmüştür. Yine ELISA ile yapılan analizlerde takrolimus konsantrasyonunun %25'e kadar fazla olduğu rapor edilmiştir. Bunun başlıca nedeninin düşük konsantrasyonlarda ELISA sisteminde girişimin olması ve buna bağlı olarak hatalı pozitif ya da negatif sonuç üretme ihtimalinin kütle sistemlerine göre daha yüksek



olmasıdır.

Kas ve iskelet sistemimizin işleyişinde önemli bir yere sahip olan D vitamini üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Günümüzde bağışıklığın yanı sıra birçok kanser türünün önlenmesindeki etkileri makalelerde sıklıkla yer almaktadır [15]. D vitaminin günlük alım dozu ve insan serumundaki seviyesinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiş ve uygulanmaktadır. Serumda veya tam kanda AOAC (The Association of Official Analytical Chemists)'in tavsiye ettiği referans metot sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi ile yapılmaktadır. Cihaz maliyetinin düşük olması nedeniyle günümüzde hastane merkez laboratuvarlarında ve rutin laboratuvarlarda genellikle ELISA, RIA veya CLIA (kemilüminesans immunoassay) kullanılmaktadır. D vitamini (D<sub>3</sub> vitamini) analizlerinde aynı numuneler kullanılarak yapılan karşılaştırmalı analizlerde tüm yöntemlerle elde edilen sonuçların birbirine paralel olduğu belirtilmiştir [16]. Düşük konsantrasyonlarda analiz yapabilme özelliğinde dolayı kütle sistemlerinin üstünlüğü vurgulansa da klinik araştırmalar sonucunda elde edilen sonuçların örtüştüğü belirlenmiştir. Ayrıca kütle sistemlerinin bir yürütmede D<sub>3</sub> vitaminin yanı sıra D<sub>2</sub> vitamini, epi-D<sub>3</sub> ve hidroksi-D<sub>3</sub> vitaminlerini de analiz edebildiği de bahsedilmiştir [16].

Plastik polimerleri yumuşatmak ve istenilen elastikiyeti kazandırmak için kullanılan bisfenol A (BPA) çok iyi bir kanserojen maddedir [17]. İnsanlar, bu tür kimyasallara günlük hayatta kullandıkları plastik materyallerden dolayı maruz kalmakta ve etkilenmektedirler. İnsan serum ve idrarında BPA analizi için LC-MS/MS, ELISA ve LC-ECD (sıvı kromatografisi-elektron capture dedektörü) sistemleri kullanılmış sonuçlar değerlendirilmiştir. ELISA yönteminin insan serum ve idrarında düşük miktarlardaki BPA'yı (0,2 ng/mL) analiz etmede yetersiz kaldığı ve özellikle idrarda girişimlerin çok fazla olduğu belirtilmiştir. LC-MS/MS ve LC-ECD sistemlerindeki sonuçların birbiriyle örtüştüğü ve iyi bir korelasyona sahip oldukları dile getirilmiştir. Ayrıca BPA'nın metaboliti olan ve idrarda düşük limitlerde bulunan BPA-glukoronitin ölçümünün LC-MS/MS ve LC-ECD sisteminde kolaylıkla yapılabildiği vurgulanmıştır [18].

## 2. Sonuç ve Öneriler

LC-MS yöntemlerinin numune analizleri yüksek doğruluk ve hassasiyete sahip olmasına rağmen pahalı bir teknik ve ölçüm süresi uzundur. ELİSA ölçümleri için özellikle insan numunelerinde ön işlem gerekliliği, çapraz reaksiyona girme eğilimi de mevcuttur. Tıbbi laboratuvarlarda yapılan

analizlerde kullanılan her iki metodun birbirlerine karşı avantaj ve dezavantajları mevcuttur [3, 18]. Bunları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz (Tablo 1).

**Tablo 1.** ELISA ve Kütle sistemlerinin Karşılaştırılması [20, 21, 22]

	<b>ELISA</b>	<b>Kütle Sistemleri (LC-MS ve LC-QTOF)</b>
<b>1</b>	Kullanılan cihaz ucuz ve kolay temin edilebilir	Cihaz pahalı ve temini zor
<b>2</b>	Cihaz kullanımı basit	Cihaz kullanımı zor ve uzmanlık (eğitim) gerektiriyor
<b>3</b>	Numune hazırlığı kolay	Numune hazırlığı zor ve analize göre çeşitli kademelerden oluşabilir
<b>4</b>	Nanogram veya nanomol limitlerinde analiz yapılabilir	Pikogram veya pikomol limitlerinde analiz yapılabilir (ELISA'dan 10-1000 kat daha hassas)
<b>5</b>	Girişim olma ihtimali yüksek	Girişim olma ihtimali çok düşük
<b>6</b>	Bir yürütmeye sadece bir analitin konsantrasyonu belirlenir	Bir yürütmeye yüzlerce analitin konsantrasyonu belirlenebilir
<b>7</b>	Cihaz bakım ve kalibrasyonu kolay	Cihaz bakım ve kalibrasyonu zor
<b>8</b>	Pozitif sonuçların doğrulanma ihtimali mevcut	Pozitif sonuçların doğrulanmasına gerek yok
<b>9</b>	Farklı matrisler için yeni yöntem şart	Farklı matrisler aynı metotta analiz edilebilir
<b>10</b>	Birim analiz maliyeti yüksek	Birim analiz maliyeti düşük

Tıbbi laboratuvarlarda üretilen sonuçlar direk olarak hasta sağlığını etkilemektedir. Elde edilen sonuçlar ile yanlış tedavi yönteminin uygulanması telafi edilemez sonuçlar doğurabilmektedir. Gelişen teknolojiye ayak uydurmak ve nitelikli elaman yetiştirmek kurumların başlıca görevlerinden biridir. Kütle sistemleri ile yapılan analizler hassas ve yüksek doğrulukta olmaktadır. Günümüzde hastane merkezi laboratuvarlarında bu cihazlar yerini almakta ve gün geçtikçe yaygınlaşmaktadır. Tıbbi laboratuvarlarda analiz edilen hormonlar, vitaminler, toksikolojik

maddeler, ilaç düzeyleri, peptitler ve moleküler yapıdaki metabolitlerin kütle sistemine entegrasyonunun yapılması ve sistemlerin optimize edilmesini de öneriyoruz.

## Kaynaklar

- [1] Msagati, T.A.M., Food Forensics and Toxicology. Johannesburg. John Wiley & Sons, 2018.
- [2] Crowther, J.R., Basic Immunology. In: ELISA pp:1–34. New Jersey. Humana Press, 1995.
- [3] Cross, T.G., Hornshaw, M.P., Can LC and LC-MS ever replace immunoassays? J Appl Bioanal, 2(4):108–116, 2016.
- [4] Fuchs, S.M., Krajewski, K., Baker, R.W., Miller, V.L., Strahl, B.D., Influence of Combinatorial Histone Modifications on Antibody and Effector Protein Recognition. Current Biology, 21(1):53–58, 2011.
- [5] de Hoffmann, E., Stroobant, V., Mass Spectrometry: Principles and Applications. 3rd ed. England. John Wiley & Sons, 2007.
- [6] Karpievitch, Y.V., Polpitiya, A.D., Anderson, G.A., Smith, R.D., Dabney, A.R., Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. Ann Appl Stat, 4(4):1797–1823, 2010.
- [7] Murphy, R.E., Kinkhikar, A.G., Shields, M.J., del Rosario, J., Preston, R., Levin, N., Ward, G., Combined use of immunoassay and two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry for the detection and identification of metabolites from biotherapeutic pharmacokinetic samples. J Pharm Biomed Anal, 53(3):221–227, 2010.
- [8] Piekoszewski W, Florek E., The role of laboratory examinations in medical toxicology. Przegl Lek., 62(10):954-9. PMID: 16521926, 2005.
- [9] Hemmings, H.C., Egan, T.D. Pharmacology and physiology for anesthesia: foundations and clinical application. Philadelphia. Elsevier/Saunders, 2013.
- [10] Kennedy, D., Dani, M., Comparative Analysis of ELISA Immunoassay and LC-QTOF for Opiate Screening. J Anal Toxicol, 44(4):410–413, 2020.
- [11] Frye, C.A., Steroids, reproductive endocrine function, and affect. A review. Minerva Ginecol, 61(6):541–562, 2009.
- [12] Yucel, K., Abusoglu, S., Unlu, A., Comparison of Immunoassay and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Methods in the Measurement of Serum Androstenedione Levels. Clin Lab, 64(1):69–75, 2018.
- [13] Fernández de Castillo Torras, L., Biterna Tejeiro, A., Pla Farnós, M.J., Ponce Sebastià, J., Treatment with ulipristal acetate (Esmya ®) and plasma levels of tacrolimus: a case report. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 203:337–338, 2016.



- [14] Staatz, C.E., Taylor, P.J., Tett, S.E., Comparison of an ELISA and an LC/MS/MS Method for Measuring Tacrolimus Concentrations and Making Dosage Decisions in Transplant Recipients. *Ther Drug Monit*, 24(5):607–615, 2002.
- [15] Norman, A.W., From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*, 88(2):491S-499S, 2008.
- [16] Arneson, W.L., Arneson, D.L., Current Methods for Routine Clinical Laboratory Testing of Vitamin D Levels. *Lab Med*, 44(1): e38–e42, 2013.
- [17] Hengstler, J.G., Foth, H., Gebel, T., Kramer, P-J., Lilienblum, W., Schweinfurth, H., Völkel, W., Wollin, K.-M., Gundert-Remy, U., Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A. *Crit Rev Toxicol*, 41(4):263–291, 2011.
- [18] Fukata, H., Miyagawa, H., Yamazaki, N., Mori, C., Comparison of Elisa- and LC-MS-Based Methodologies for the Exposure Assessment of Bisphenol A. *Toxicol Mech Methods*, 16(8):427–430, 2006.
- [19] Gandhi, A.S., Budac, D., Khayrullina, T., Staal, R., Chandrasena, G., Quantitative analysis of lipids: a higher-throughput LC–MS/MS-based method and its comparison to ELISA. *Future Sci OA*, 3(1): FSO157, 2017.
- [20] Gross, M. S., Woodward, E. E., & Hladik, M. L., Evaluation of ELISA for the analysis of imidacloprid in biological matrices: Cross-reactivities, matrix interferences, and comparison to LC-MS/MS. *Chemosphere*, 286(3): 131746, 2022.
- [21] Tron, C., Lemaitre, F., Bros, P., Goulvestre, C., Franck, B., Mouton, N., & Blanchet, B., Quantification of infliximab and adalimumab in human plasma by a liquid chromatography tandem mass spectrometry kit and comparison with two ELISA methods. *Bioanalysis*, 14(11): 831-844, 2022.
- [22] Foulon, N., Goonatilleke, E., MacCoss, M. J., Emrick, M. A., & Hoofnagle, A. N., Multiplexed Quantification of Insulin and C-peptide by LC-MS/MS without the Use of Antibodies. *Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab.*, 25:19-26, 2022.