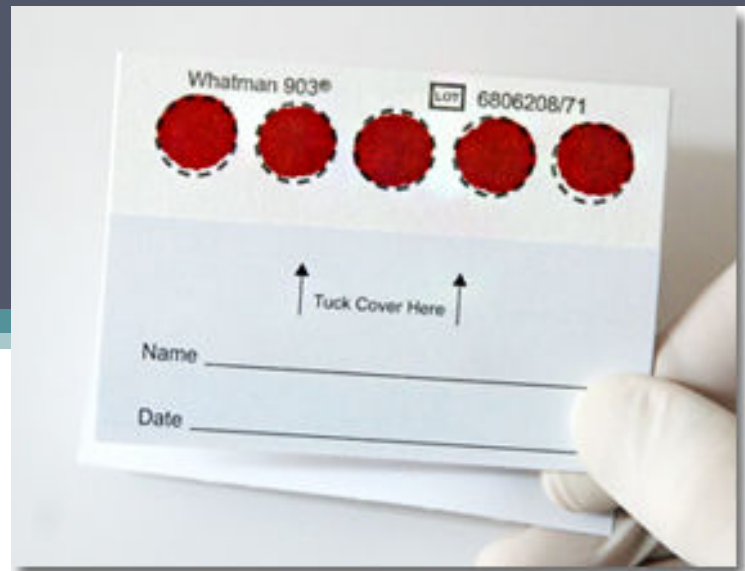


Adaptation d'un kit commercial LC-MS/MS pour le dosage du tacrolimus sur dried blood spots



C. Haeseleer, F. Wolff, G. Deprez, F. Cotton

Laboratoire de Chimie Médicale, LHUB-ULB, Hôpital Erasme

Plan

- 1) Introduction
- 2) Mise au point du protocole
- 3) Calibration
- 4) Validation
- 5) Conclusions, solutions et perspectives

Introduction



Tacrolimus

- Immunosuppresseur
- **Indications** : prévention du rejet de greffe de rein, foie et cœur et ttt du rejet en cas de résistance aux autres immunosuppresseurs
- **Mode d'action** : inhibition de la calcineurine => inhibition de l'activation des lymphocytes T et de leur prolifération (via la synthèse d'IL-2)
- **Effets Indésirables** : néphrotoxicité, hyperT, neurotoxicité, diabète, hyperK+, hyperuricémie et hyperlipidémie, alopecie réversible.

Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique

- **Marge thérapeutique** : 5-20 μ g/L
=> *étroite*
- **Biodisponibilité (voie orale)** : 4 à 89% (25% en moyenne)
- **Demi-vie** : 6-30h
- **Lié à 98%** aux GR
- **Substrat** : p-glycoprotéine et CYT P450 3A4 et 5
=> *énorme variabilité intra- et interindividuelle*

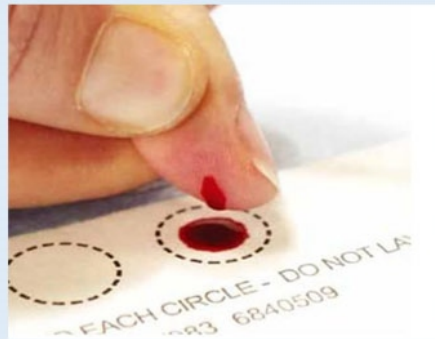
Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique

- Mesure des concentrations sanguines

⇒ individualisation et optimisation de la posologie

Rejet ($<5\mu\text{g/L}$) \longleftrightarrow action optimale \longleftrightarrow toxicité ($>20\mu\text{g/L}$)

Dried Blood Spots



DBS et suivi thérapeutique pharmacologique

Avantages

- Compliance du patient ↗
- Meilleur suivi
- Stabilité et facilité
- Dosage sur sang total

Inconvénients

- Méthode de collecte exigeante
- LC-MS/MS nécessaire
- Prétraitement de l'échantillon
- Influence de l'hématocrite

Mise au point du protocole



Adaptation du protocole de prétraitement de l'échantillon d'un kit pour le dosage du tacrolimus sur DBS

Expériences préliminaires



Optimisation de l'extraction

Le kit

« Immunosuppresseant in Whole Blood » MassTox® ONEminute test (Chromsystems®)

- phase mobile A, phase mobile B, précipitant, solution de lavage, standard interne (SI), tampon d'extraction, calibrateurs 6PLUS1®, vials de prétraitement teintés, colonne analytique et trap column
- contrôles MassCheck (*Whole Blood Control*) : 4 niveaux, blanc

Matériel

- **Système LC** : Agilent Technologies® , série 1260
- **Spectromètre de masse** triple quadripôle : Agilent Technologies® , série 6460 Triple Quad
ESI mode positif - détection en mode MRM
- **Bain à ultra-sons** : Branson 2200 ultrasonic cleaner®
- **Perforatrice** : Puncher Neonat Hb Sebia®

Réactifs

- **Papier buvard** Schleicher & Schuell 903 (*Sigma Aldrich*®)
(Whatman 903®)
- **Tacrolimus** en poudre (FK-506 monohydraté) (*Sigma Aldrich*®)

Echantillons

- échantillons de patients du jour
- sang total sur EDTA
- avec ou sans tacrolimus

Protocole de prétraitement de base sur sang liquide

- 50 μL sang dans un tube Eppendorf
- 25 μL solution de SI + 100 μL de tampon d'extraction
- vortex 10 sec., incubation à t° amb. 2 min.
- + 250 μL sol. de précipitation
- vortex 1 min., incubation 2min., centrifugation 10 min. 13 000 rpm

1ère expérience

- 3 échantillons
 - taches de 50µl sur papier buvard
 - séchage 3 h à t° ambiante
 - 4 disques (4mm de diam.)/tache dans 1 tube Eppendorf®
+20 µl solution de SI et « x » µL de tampon d'extraction
- ⇒ 1 min. vortex et 15 min. bain à ultrasons
- ⇒ « déprotéinisation »
- ⇒ centrifugation 10 min. à 13 000 rpm.
- ⇒ surnageant transféré dans un insert pour l'injection.

1ère expérience

4 conditions testées :

- **Volume de tampon d'extraction** : 200 vs 300 μ l
(au lieu de 100 μ l, protocole sang total)
- **Déprotéinisation** :
10 min. -20°C (*Koster et al., 2013*) vs 250 μ L sol. précipitation

=> Comparaison avec les 3 échantillons de sang liquide

Comparaison de l'aire du tacrolimus sur DBS et sur sang liquide

C ($\mu\text{g/L}$)	(1) 200 μL tp extraction + 250 μL sol. précipitation	(2) 200 μL tp extraction -20°C, 10min	(3) 300 μL tp extraction + 250 μL sol. précipitation	(4) 300μL tp extraction -20°C, 10min
23,4	39%	53%	37%	37%
8,6	39%	51%	34%	37%
4,8	38%	61%	50%	40%

2ème expérience

- 5 échantillons
- concentrations plus faibles concentrations par / à la 1^{ère} expérience
- **Solution SI diluée 2x par sol. H₂O:acétonitrile 50:50(v/v)**

Comparaison de l'aire du tacrolimus sur DBS et sur sang liquide

C ($\mu\text{g/L}$)	(1) 200 μL tp extraction + 250 μL sol. précipitation	(2) 200 μL tp extraction -20°C, 10min	(3) 300 μL tp extraction + 250 μL sol. précipitation	(4) 300μL tp extraction -20°C, 10min
15	32%	53%	34%	37%
11,25	31%	56%	36%	35%
7,5	42%	60%	33%	39%
3,75	47%	62%	35%	47%
1,875	46%	67%	47%	18%

Durée d'ultrasonication

- 4 échantillons (13 , 6.5, 3.2 et 1.6 $\mu\text{g/l}$)
- condition (1) : 200 μL tp extraction + 250 μL sol. précipitation
- **15 min. vs 30 min. au bain à ultra-sons.**

Durée d'ultrasonication

Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Aire _{tacrolimus} / aire _{SI} (15 min)	Aire _{tacrolimus} / aire _{SI} (30min)	Biais
13	0,59	0,66	10%
6,5	0,33	0,30	-10%
3,2	0,16	0,18	11%
1,6	0,11	0,09	-22%
0	0,004	0,01	68%

Amélioration du signal

- **Temps d'extraction allongés**

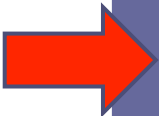
Vortex 5 min. + ultrasons 30 min. **vs** vortex 1 min. + ultrasons 15 min.

- **Concentration de l'extrait** : surnageant (après centrifugation) évaporé à sec à t° amb. sous flux N₂ et reconstitué dans 100 µL de phase mobile B **vs** pas de concentration

=> 4 conditions testées sur un pool de tacrolimus à **2 µg/L**
(5 taches /condition)

Amélioration du signal

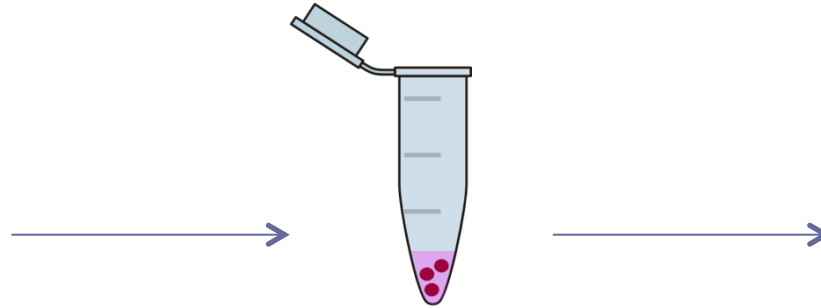
CV% (aire) obtenu sur une pool à 2 µg/L (n=5 par condition)

	Condition	Tacro	SI	Rapport
1	vortex 1 min ultrasons 15 min extrait non concentré	30%	4%	28%
2	vortex 5 min ultrasons 30 min extrait non concentré	25%	4%	22%
 3	vortex 1 min ultrasons 15 min extrait concentré	<u>12%</u>	<u>4%</u>	<u>14%</u>
4	vortex 5 min ultrasons 30 min extrait concentré	15%	14%	23%

Mode opératoire final



Tache de 50 μ l de sang séché :
4 disques 4mm dans un tube



+ 20 μ l SI diluée +
200 μ l Tp extraction



1 min vortex



15 min ultrasons



250 μ l précipitant + 1 min
vortex + 10 min 13 000 rpm



Evaporation
surnageant



Reconstitution dans 100 μ l de
phase mobile B et injection

Calibration



Calibration

Calibrateurs commerciaux du kit
(lyophilisés et reconstitués)

vs

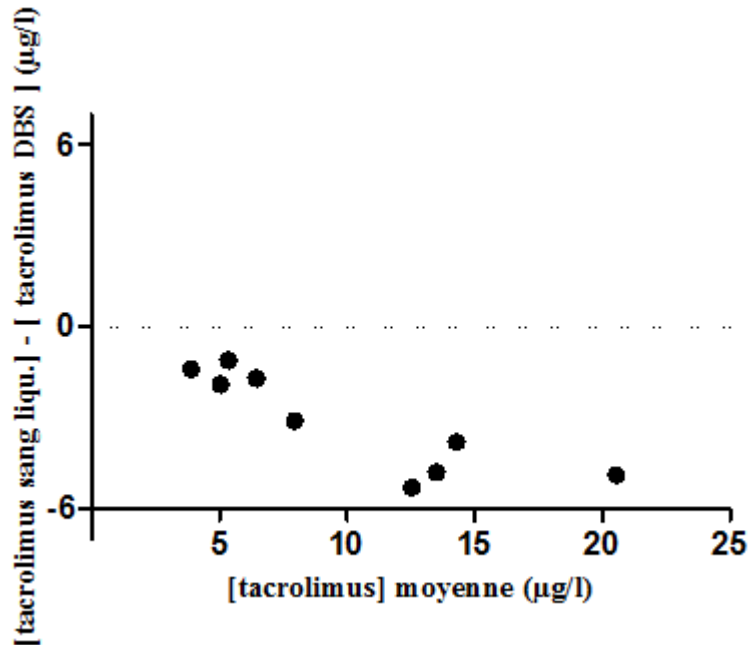
calibrateurs sur sang frais préparés au labo

Préparation des calibrateurs sur sang frais

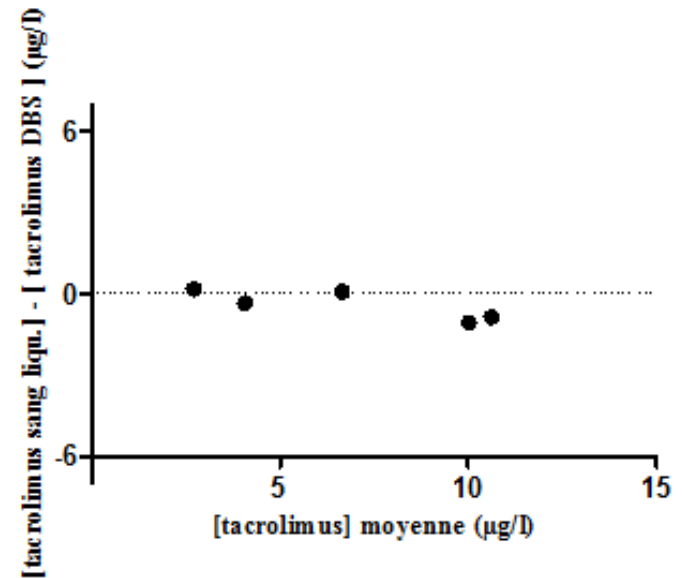
- Solution stock méthanolique de tacrolimus (10 mg/L), diluée 20X avec du méthanol
 - ⇒ solution de travail à 500µg/l , dilutions avec du méthanol
 - ⇒ solutions intermédiaires (300 – 250 – 150 – 100 – 50 et 25 µg/l), dilution 10x avec du sang frais sur EDTA
 - ⇒ calibrateurs (30 – 25 – 15 – 10 – 5 et 2.5 µg/L)

Calibration

**Calibrateurs lyophilisés
(n= 9)**



**Calibrateurs sur sang frais
enrichis (n = 5)**



Validation

A decorative graphic consisting of several horizontal lines in teal and white, extending across the width of the slide below the title.

1) LOD, LOQ

2) Précision, fidélité intermédiaire

2 pools de sang (basse et haute concentration), analyse de 2 taches / conc. / jour pendant 10 jours

=> reproductibilité, répétabilité et fidélité intermédiaire

3) Stabilité

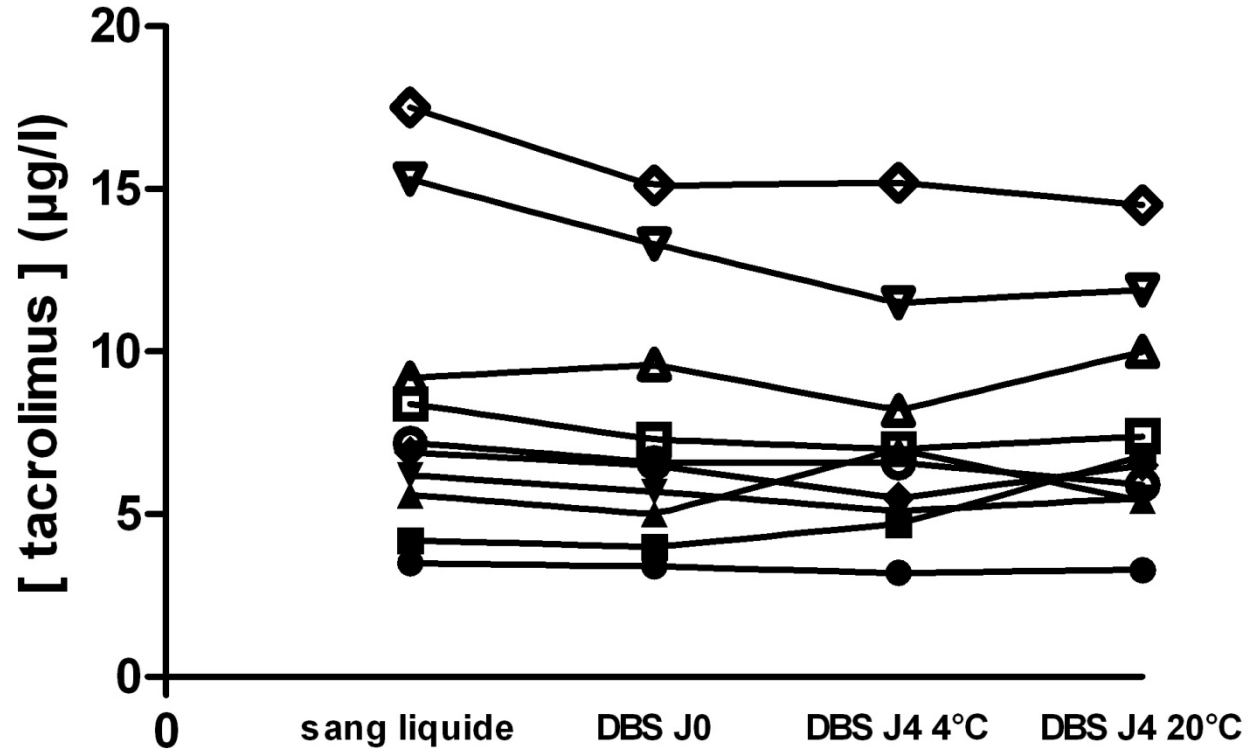
Après 4 jours, 10 échantillons de patients conservés à t° amb. (à l'air libre) et à 4°C (dans le noir dans une pochette plastique)

4) Comparaison avec le sang liquide

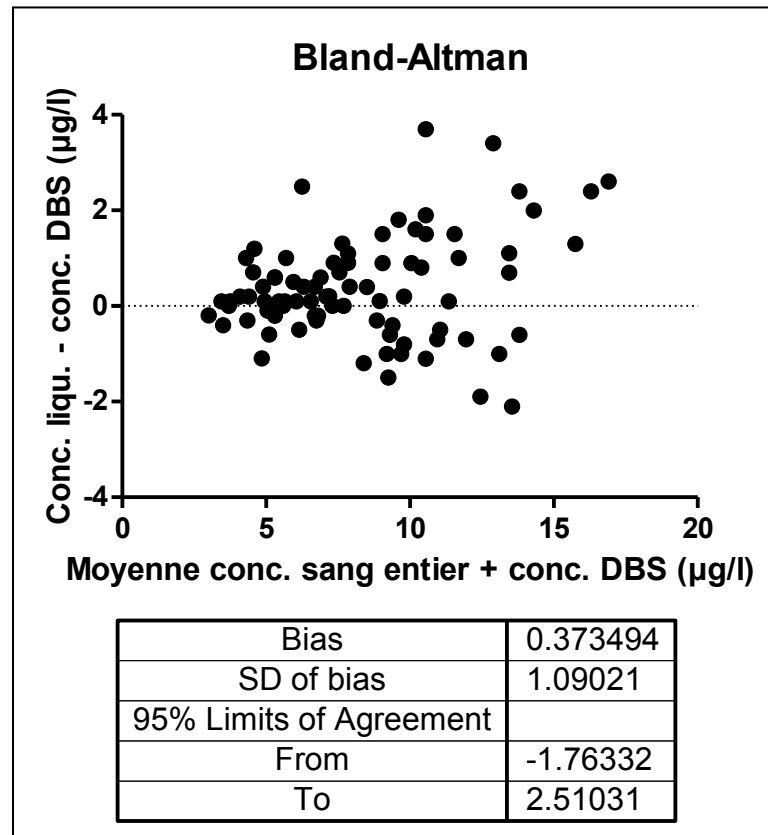
Performances analytiques

Méthode	DBS	Sang liquide
Limite de détection	1 µg/L	0,5 µg/L
Limite de quantification	2 µg/L	1,2 µg/L
Fidélité intermédiaire	7,4-9,3 %	5.0-7.0 %

Stabilité



Comparaison DBS versus sang liquide (n = 83)



Conclusions, solutions et
perspectives ...

A decorative graphic element consisting of a solid teal horizontal bar that spans the width of the slide. Below this bar, on the right side, there are several thin, parallel horizontal lines in shades of teal and white, creating a layered, stepped effect.

Conclusions

- Mise au point d'un protocole d'extraction
- Réactifs du kit utilisés avec succès sauf calibrateurs
- Mode opératoire plus long et plus lourd
- Bonnes performances analytiques, corrélation avec le sang liquide et stabilité

Solutions et perspectives

- Standard interne introduit dans la solution d'extraction donc pas extrait avec l'analyte
- Optimisation de l'extraction?
=> *réduction du volume de solution de précipitation, perforer un seul grand disque, ...*
- Réduire le volume de sang appliqué ?
=>+ *représentatif de la pratique*

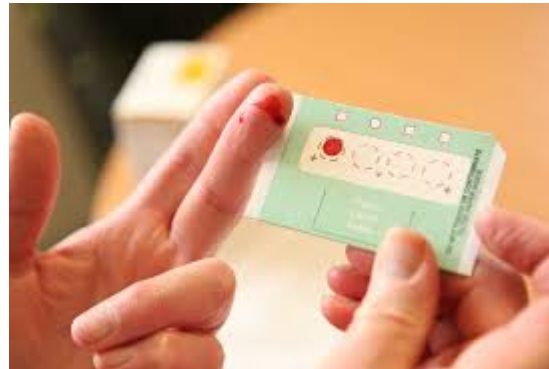
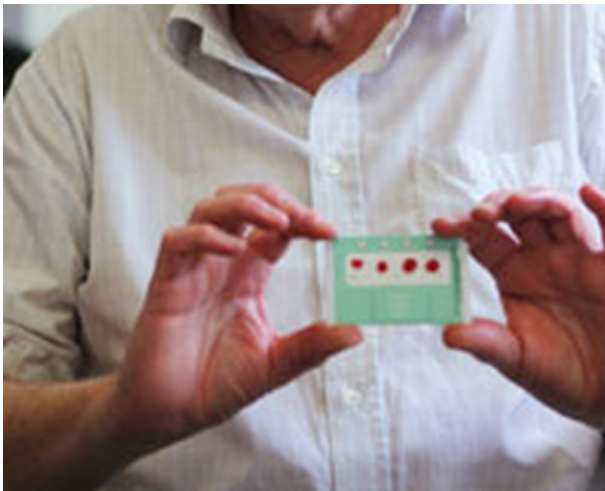
Solutions et perspectives

- Valider la stabilité et la reproductibilité des calibrateurs sur sang frais
- Valider la stabilité à plus long terme
- Confirmer la non influence de l'hématocrite sur la mesure du tacrolimus

Perspectives

- Tester la méthode pour les autres immunosuppresseurs (sirolimus, évérolimus et ciclosporine A)
- Mettre au point et valider la méthode sur de vrais patients

Merci de votre attention ! ...



Questions?

