

# 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

A decorative graphic consisting of a solid teal horizontal bar that spans the width of the slide. Below this bar, on the right side, there are several horizontal lines of varying lengths and colors, including teal and white, creating a layered, stepped effect.

# 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 $\mu$ 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*

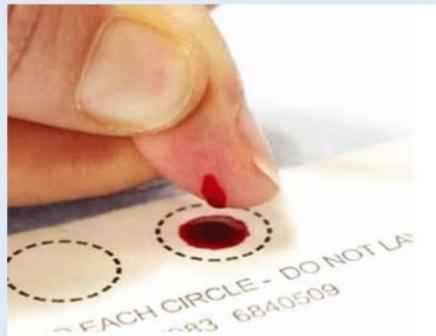
# Intérêt du suivi thérapeutique pharmacologique

- 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  $\mu\text{L}$  sang dans un tube Eppendorf
- 25  $\mu\text{L}$  solution de SI + 100  $\mu\text{L}$  de tampon d'extraction
- vortex 10 sec., incubation à  $t^\circ$  amb. 2 min.
- + 250  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ l  
(au lieu de 100 $\mu$ l, protocole sang total)
- **Déprotéinisation** :  
10 min. -20°C (*Koster et al., 2013*) vs 250  $\mu$ L sol. précipitation

=> Comparaison avec les 3 échantillons de sang liquide

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

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

# 2ème expérience

- 5 échantillons
- concentrations plus faibles concentrations par / à la 1<sup>ère</sup> expérience
- **Solution SI diluée 2x par sol. H<sub>2</sub>O:acétonitrile 50:50(v/v)**

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

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

# Durée d'ultrasonication

- 4 échantillons (13 , 6.5, 3.2 et 1.6 µg/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 <sub>tacrolimus</sub> / aire <sub>SI</sub> (15 min)	Aire <sub>tacrolimus</sub> / aire <sub>SI</sub> (30 min)	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**

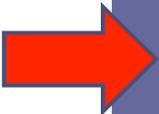
Vortex 5 min. + ultrasons 30 min. **vs** vortex 1 min. + ultrasons 15 min.

- **Concentration de l'extrait** : surnageant (après centrifugation) évaporé à sec à t° amb. sous flux N<sub>2</sub> 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

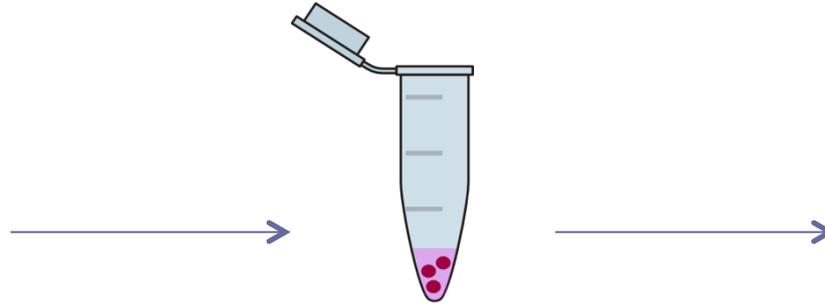
CV% (aire) obtenu sur une pool à 2 µg/L (n=5 par condition)

	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 $\mu$ l de sang séché :  
4 disques 4mm dans un tube



+ 20  $\mu$ l SI diluée +  
200  $\mu$ l Tp extraction



1 min vortex



15 min ultrasons



250  $\mu$ l précipitant + 1 min  
vortex + 10 min 13 000 rpm



Evaporation  
surnageant



Reconstitution dans 100 $\mu$ l de  
phase mobile B et injection

# Calibration

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

# Calibration

Calibrateurs commerciaux du kit  
(lyophilisés et reconstitués)

VS

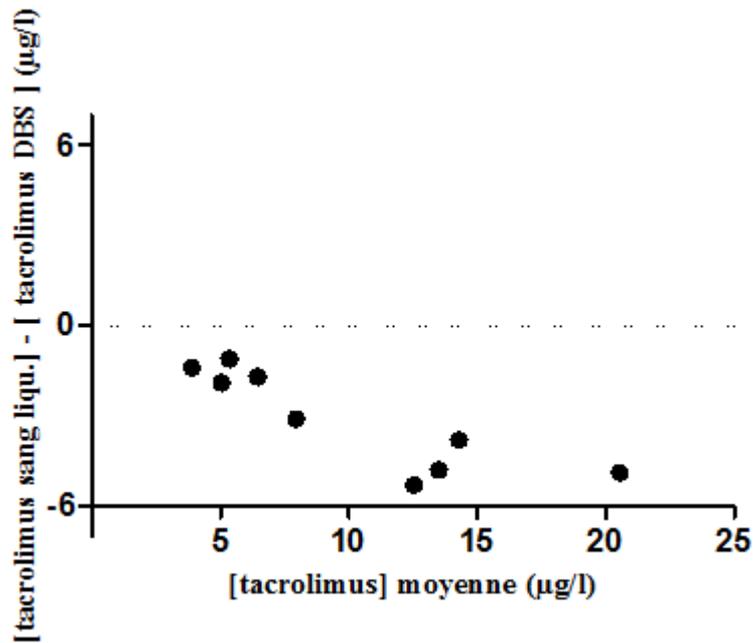
calibrateurs sur sang frais préparés au labo

# Préparation des calibrateurs sur sang frais

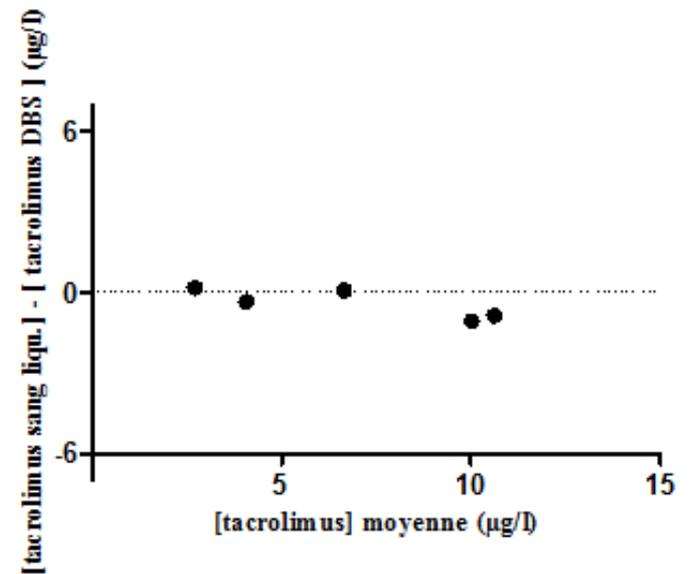
- Solution stock méthanolique de tacrolimus (10 mg/L), diluée 20X avec du méthanol
  - ⇒ solution de travail à 500µg/l , dilutions avec du méthanol
  - ⇒ solutions intermédiaires (300 – 250 – 150 – 100 – 50 et 25 µg/l), dilution 10x avec du sang frais sur EDTA
  - ⇒ calibrateurs (30 – 25 – 15 – 10 –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

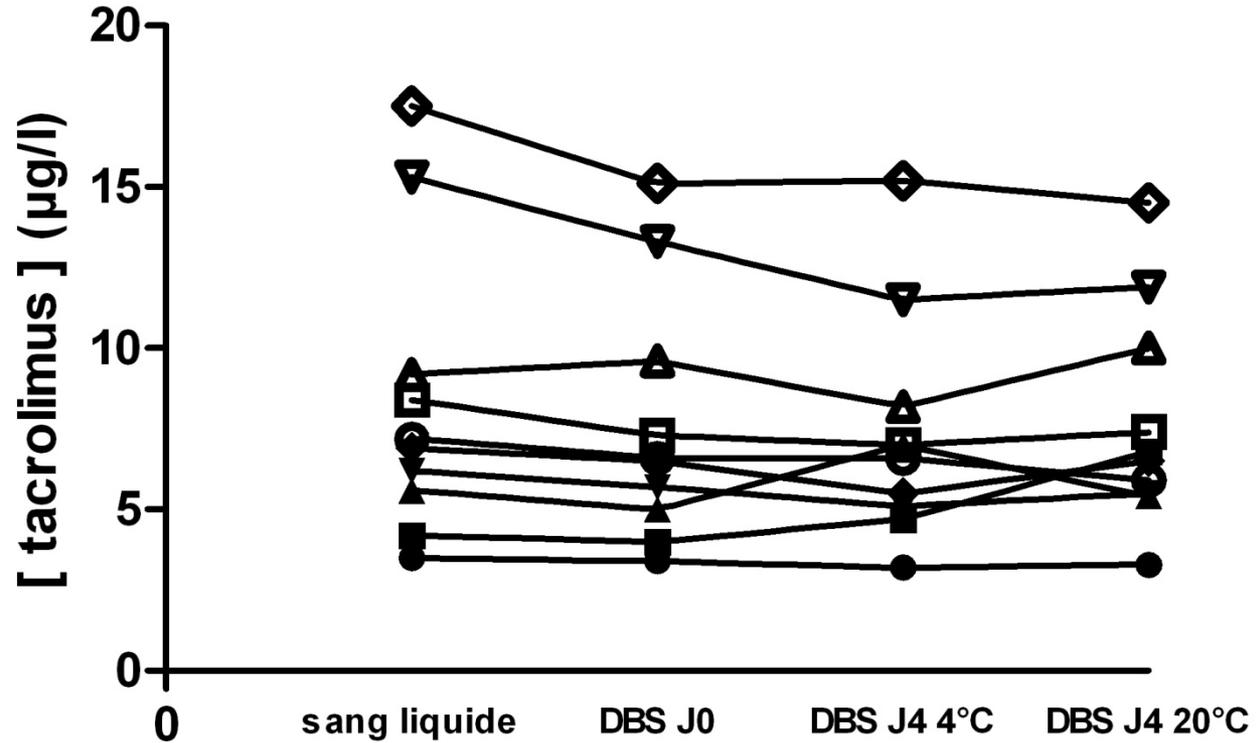
Après 4 jours, 10 échantillons de patients conservés à t° amb. (à l'air  
libre) et à 4°C (dans le noir dans une pochette plastique)

## 4) Comparaison avec le sang liquide

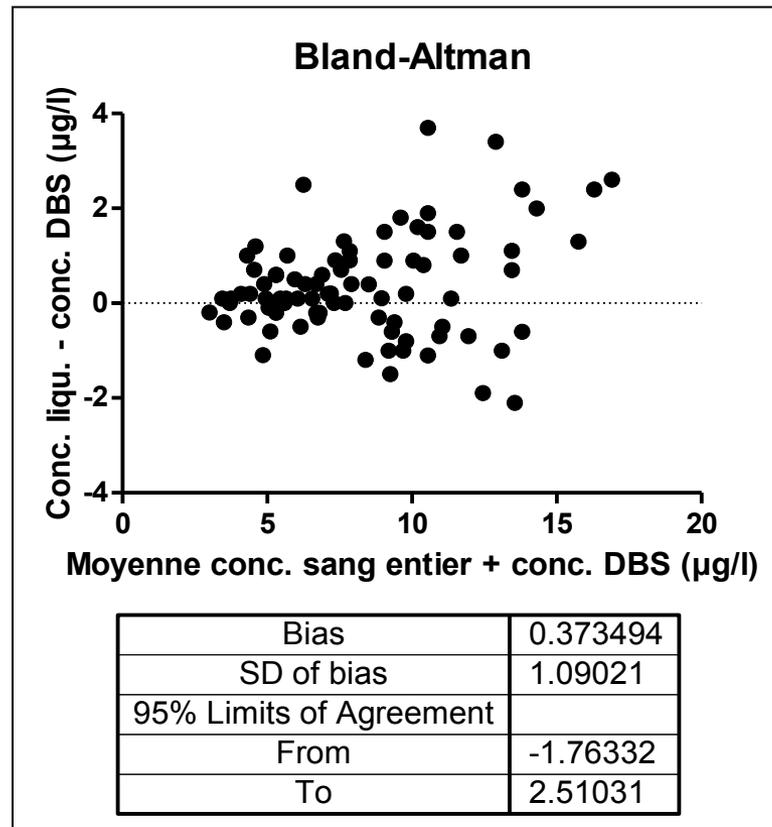
# Performances analytiques

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 white and light teal, 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*

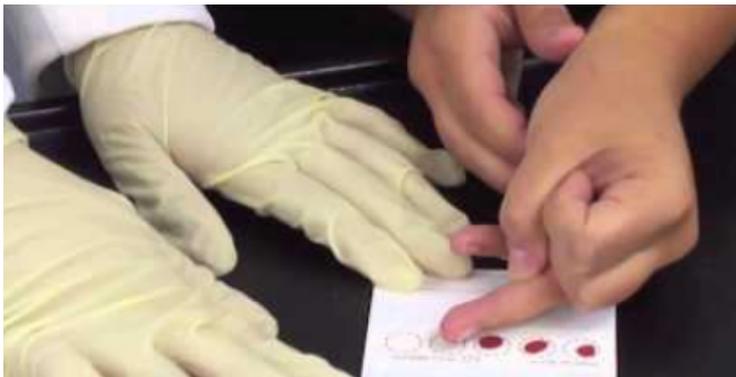
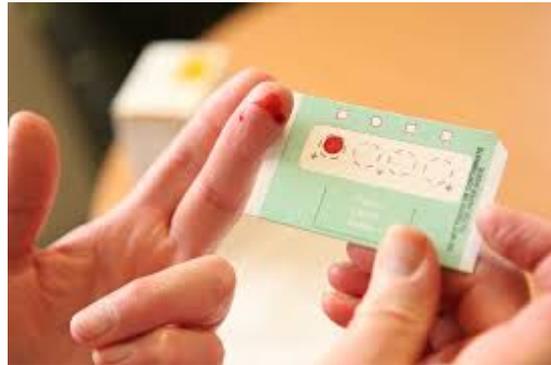
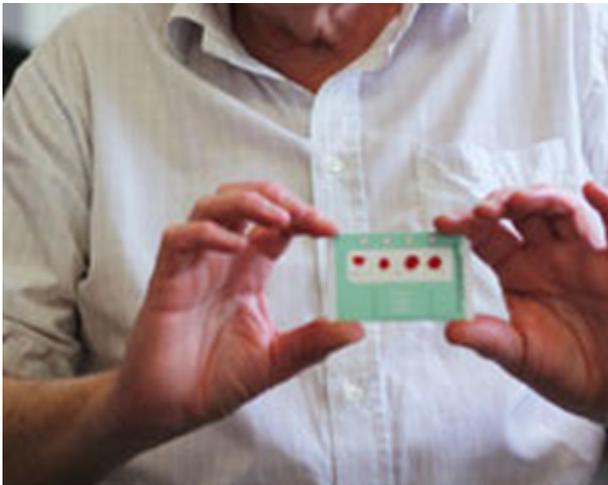
# Solutions et perspectives

- 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?

