

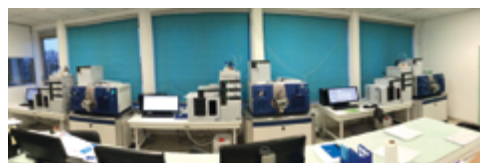
# Dosage de la Ciclosporine, Tacrolimus, Evérolimus et Sirolimus en LCMSMS avec le coffret MassTox Chromsystems sur Api 4500 ABSciex avec préparation automatisée sur Técan EVO 150



Biomnis

I. PETIT\*, C. MOUSSA, K. BONNET, A. BEZOL, S. HAVREZ, P. GERRIER

Laboratoire Eurofins Biomnis, Ivry-Sur-Seine, France



## Introduction

L'objectif de ce travail est de présenter la validation technique et la mise en place du dosage de 100 000 immunosuppresseurs (IS) par an : Ciclosporine, Tacrolimus, Evérolimus et Sirolimus dosés simultanément avec le kit MassTox de Chromsystems sur 3 systèmes LCMSMS SCIEIX API TQ 4500MD (MS1, MS2, MS3) en miroir et une préparation entièrement automatisée sur 2 Técan EVO 150 avec centrifugeuse Rotenta de HETTICHE intégrée.

## Méthode

La préparation des échantillons de sang total frais réfrigérés consiste en une simple précipitation des protéines en microplaque de 96 puits. Les surnageants passent dans une colonne trap pour purification avant séparation analytique. Le procédé de fragmentation est l'ionisation par électrospray (ESI). Le mode de mesure de la technique MS/MS utilise le Multiple Reaction monitoring (MRM). Une gamme d'étalonnage à 7 points est effectuée dans chaque microplaque, 4 niveaux de contrôles sont placés en début de série et un niveau de contrôle tous les 22 échantillons.

Les performances analytiques ont été évaluées pour les 4 IS sur 4 niveaux de contrôle (CQ1, CQ2, CQ3 et CQ4) du kit Chromsystems sur MS1, MS2 et MS3 :

- La **répétabilité** a été établie à partir de 15 dosages de chaque niveau sur chaque système.
- La **fidélité intermédiaire (FI)** a été établie sur 30 dosages de chaque niveau sur

	Cible en µg/L			
	CQ1	CQ2	CQ3	CQ4
Ciclosporine	51.1	258	492	1123
Tacrolimus	2.6	7.1	14.8	32.2
Evérolimus	2.7	5.1	9.8	34.6
Sirolimus	2.9	10.0	19.6	38.9

chaque système.

- Une **comparaison de méthode** entre la technique LCMSMS sur MS1, MS2 et MS3 et la technique immuno-enzymatique sur RXL® SIEMENS pour la Ciclosporine et Architect® ABBOTT pour le Tacrolimus a été effectuée. Les résultats ont été traités par la méthode de régression linéaire.
- Une **corrélation des 3 LCMSMS** en miroir a été établie. La comparaison de méthodes pour Ciclosporine et Tacrolimus ainsi que la corrélation des 3 LCMSMS pour les 4 IS ont été évaluées sur 35 échantillons de sang total frais dont les concentrations en immunosuppresseurs couvrent le domaine de mesure des techniques.
- Un **seuil de quantification et domaine de linéarité** ont été établis pour les 4 IS sur les 3 LCMSMS à partir de matériels de référence (Cerilliant, TRC).
- L'**exactitude** est évaluée par 3 enquêtes ASQUALAB soit 102 dosages par an pour Ciclosporine, Tacrolimus et Sirolimus et 51 dosages par an pour l'Evérolimus.

## Résultats

### CV de Répétabilité sur MS1

IS	CV CQ1(%)	CV CQ2(%)	CV CQ3(%)	CV CQ4(%)
Ciclosporine	3.66	4.37	7.03	7.73
Tacrolimus	9.50	4.31	5.95	4.49
Evérolimus	3.80	5.10	3.10	2.50
Sirolimus	4.30	2.40	4.00	2.60

Les CV de répétabilité répondent aux exigences attendues et les tests de répétabilité effectués sur MS2 et MS3 ne présentent pas de différence significative par rapport à ceux effectués sur MS1.

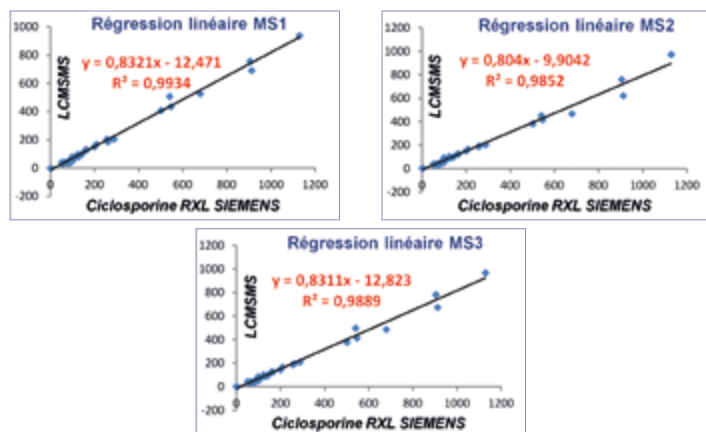
### CV de Fidélité intermédiaire sur MS1

IS	CV %	CQ1	CQ2	CQ3	CQ4
Ciclosporine	6.77	8.43	6.82	6.69	6.69
Tacrolimus	9.06	7.39	6.04	5.62	5.62
Evérolimus	12.69	8.48	8.70	5.14	5.14
Sirolimus	9.03	7.85	6.82	5.94	5.94

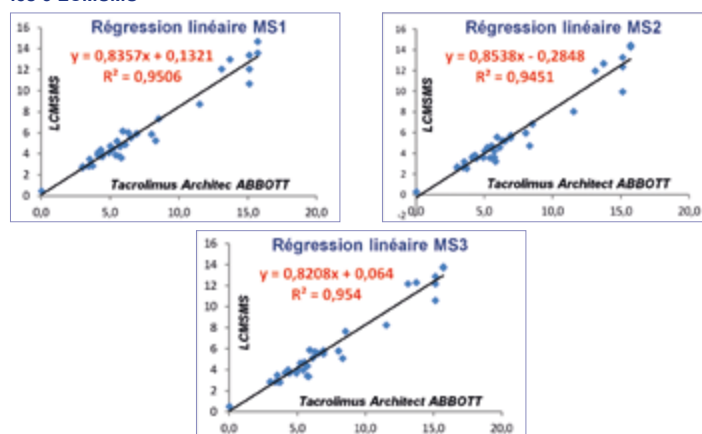
Les CV de FI répondent aux exigences attendues et les tests de FI effectués sur les MS2 et MS3 ne présentent pas de différence significative par rapport à ceux effectués sur MS1.

### Comparaison de méthodes

#### LCMSMS et RXL SIEMENS pour la Ciclosporine : droites de régression sur les 3 LCMSMS



#### LCMSMS et Architect ABBOTT pour le Tacrolimus : droites de régression sur les 3 LCMSMS



Les résultats de comparaison entre les techniques LCMSMS et immuno-enzymatique montrent une différence expliquée par la spécificité du dosage en LCMSMS (la technique immuno-enzymologie dosant en excès les métabolites inactifs)

### Corrélation des 3 systèmes en miroir

Les résultats présentés sont ceux de la Ciclosporine par les équations de régression linéaire. Ils montrent une corrélation acceptable. Les résultats pour le Tacrolimus, l'Evérolimus et le Sirolimus ne montrent pas de différence significative par rapport aux résultats de la Ciclosporine.

$$\begin{aligned} \text{MS1/MS2} &= 0.9670x + 1.9892 \\ \text{MS1/MS3} &= 0.9996x + 0.5292 \\ \text{MS2/MS3} &= 0.9681x + 2.3681 \end{aligned}$$

### Seuil de quantification et domaine de linéarité : établie sur MS1, MS2 et MS3

IS	LOQ (µg/L)	Limite haute de linéarité
Ciclosporine	10.0	2000
Tacrolimus	0.5	100
Evérolimus	0.5	100
Sirolimus	0.5	100

- **Exactitude** : résultats des EEQ ASQUALAB pour les 4 IS sur MS1, MS2 et MS3 pour 2015 et 2016 : **Z scores < 2.8** (comparaison avec les groupes de pairs). Les résultats sont conformes aux exigences attendues.

## Conclusion

Après un recul de 2 années d'activité, nous pouvons confirmer la robustesse de la technique et la qualité des performances analytiques attendues. Les 100 000 dosages annuels se répartissent en moyenne par le dosage de 320 échantillons par jour 6 jours sur 7 avec un rendu de 75 % des résultats le jour même du dosage et 25% le

lendemain. La préparation d'une microplaque (85 patients) est réalisée en 1h30 et le dosage LCMSMS en 4h. Les 4 premières plaques du jour peuvent être rendues avant 18h. Une procédure d'urgence par suivi du dossier, permet de doser le prélèvement en priorité et de rendre le résultat le jour même.

### Références bibliographiques

Gressner A.M., Arndt T. *Lexikon der Medizinischen Laboratorium Diagnostik. Band 1 : Klinischechemie. L. Aufl.*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg (2007)

Analyses de biologie médicale : spécifications de normes d'acceptabilité à l'usage des la validation de techniques. A. Vassault et al. *Annales de Biologie Clinique*