

DOSAGE DES STÉROÏDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM AVEC PRÉPARATION AUTOMATISÉE DE L'ÉCHANTILLON

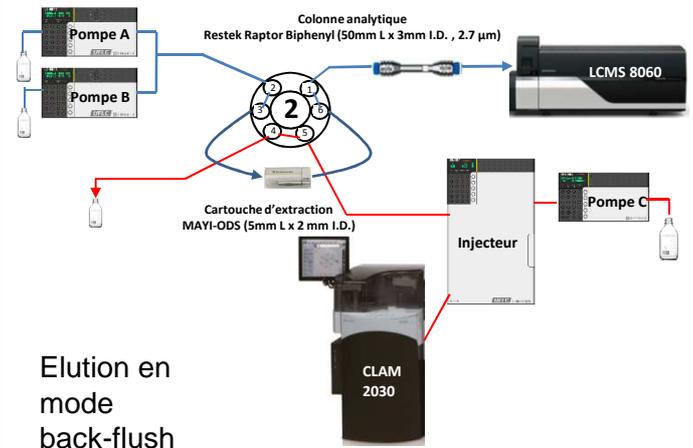
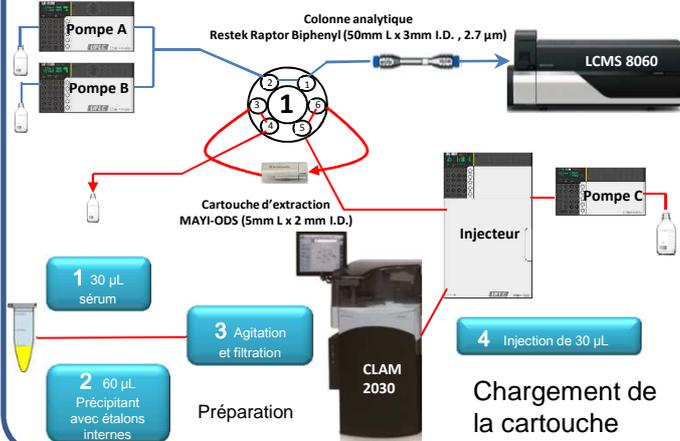
François Fraissinet¹, Tony Pereira², Frédéric Ziegler^{1,3}, Valéry Brunel¹

¹ Service de Biochimie Générale, CHU de Rouen, ² Service de Pharmacologie, CHU de Rouen, ³ INSERM U1073, Université de Rouen

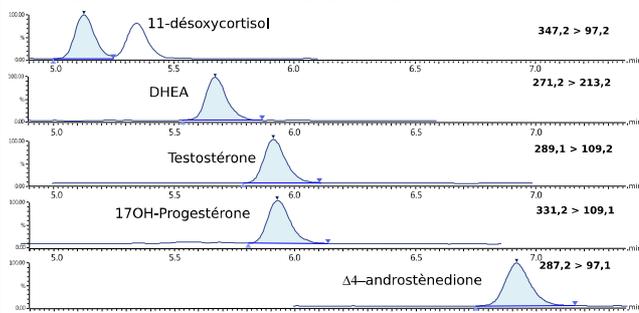
INTRODUCTION

La spectrométrie de masse est considérée actuellement comme la méthode de référence pour le dosage des stéroïdes dans le sérum. L'analyse nécessite une préparation souvent manuelle de l'échantillon par précipitation des protéines suivie par une extraction liquide-liquide ou solide-liquide, cette dernière pouvant s'effectuer en ligne directement sur l'analyseur (2D LC-MS/MS). L'objectif du travail consiste à développer et valider une méthode de dosage de 5 stéroïdes : Testostérone (T), Δ 4-androstènedione (D4), 17OH-progèsterone (17OHP), 11-désoxycortisol (11-DF), DHEA avec une préparation complètement automatisée de l'échantillon sur le système LCMS 8060 couplé au préparateur d'échantillons CLAM 2030 (Shimadzu®). La méthode a été validée selon les recommandations de l'EMA (European Medicines Agency).

MATÉRIEL ET MÉTHODES



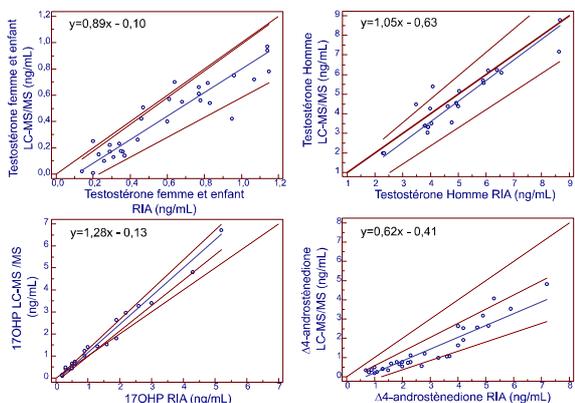
RÉSULTATS ET DISCUSSION



	Répétabilité (moyenne ng/mL, CV %) n=6								Reproductibilité (moyenne ng/mL, CV %) n=30					
	LOQ	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	
T	0,04	9,3	0,19	3,0	1,44	0,9	7,76	1,0	0,19	3,8	1,47	2,3	7,60	2,9
D4	0,07	10,6	0,28	3,0	1,24	1,2	10,5	0,9	0,26	3,2	1,09	1,7	8,86	2,4
17OHP	0,10	3,5	0,30	2,2	1,51	2,3	8,88	1,4	0,28	3,9	1,46	2,0	8,35	2,6
11DF	0,09	11	0,32	4,2	1,46	1,9	9,98	0,8	0,26	5,5	1,33	3,8	8,20	5,5
DHEA	0,79	8,7	1,92	8,4	11,1	1,7	37,6	3,6	1,85	8,1	12,2	4,7	39,5	5,3

Les coefficients de variation (CV %) obtenus sur 3 niveaux de contrôles pour la répétabilité et la reproductibilité sont tous inférieurs à 10 %, aux CV limites établis par RICOS et en accord avec les méthodes précédemment décrites utilisant une méthode manuelle.

Les limites de quantification assimilées au premier point de gamme (LOQ) sont satisfaisantes et adaptées pour doser les échantillons pédiatriques.



La nouvelle méthode LC-MS/MS a été comparée avec les trousse RIA utilisées jusqu'alors au laboratoire avec extraction préalable du sérum par l'éther éthylique (Beckman®). Pour la testostérone, chez l'homme, les résultats sont comparables avec la RIA alors que chez la femme et l'enfant, la LC-MS/MS présente un biais moyen de -11 %. La Δ 4-androstènedione présente en LC-MS/MS un biais important de -38 % par rapport à la RIA et la 17OHP un biais de + 28 %. Ceci s'explique par un manque de spécificité des anticorps utilisés en RIA et nécessite l'utilisation de valeurs de référence adaptées à la LC-MS/MS avec un dialogue clinico-biologique.

CONCLUSION

La préparation automatisée montre des performances analytiques similaires aux études précédentes [1,2]. Elle permet de réduire le volume de sérum nécessaire et un gain de temps pour le rendu du résultat.