

HTA d'origine endocrinienne : l'aide du laboratoire

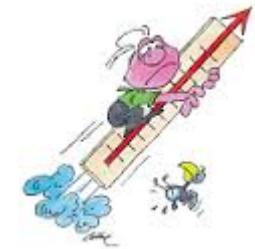
C. Le Goff

1/10/2014

Corata Reims 2^{ème} édition (1-2 octobre 2014)

Exploration ...

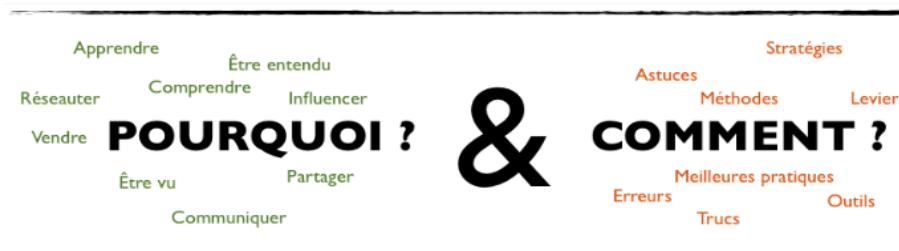
- La démarche diagnostique repose sur :
 - l'examen clinique et l'interrogatoire du patient
 - des dosages biologiques simples
- Les tests hormonaux nécessaires au diagnostic sont coûteux.
 - Ne pas demander à titre systématique.
- Les tests dynamiques doivent être confiés au spécialiste.
- Ne pas demander un examen d'imagerie sans avoir obtenu la preuve diagnostique par les examens hormonaux.



Sujets du jour:

- Le cortisol urinaire et salivaire
- L'aldostérone plasmatique et urinaire

en LC-MS/MS



Aldostérone et Cortisol

Pour

- Coût faible
- Automatisé
- Pas de développement

Contre

- RIA → locaux adaptés
- Sensibilité <75 ng/L
- Spécificité ----
- Plus de consommables

LC-MS/MS

Aldostérone et Cortisol

Pour

- Moins couteux
- Moins d'interférence
- Méthode de référence
- Pas de variabilité de lot à lot
- Sensibilité
- LOQ aldo:20 ng/L, LOQ CTU= 1.5 µg/L
- Fermeture des labos RIA

Contre

- Prix de la LCMSMS
- Développement +++
- Technique +++
- Bruyant et chaud
- Azote (générateur) et air comprimé
- Révision des pics un à un
- Contrat maintenance/an+++

Informations apportées par la LC-MS/MS

- 1- La masse moléculaire d'un composé
- 2- La masse des fragments de ce composé
- 3- Une concentration

Principes de la LC-MS/MS

- **1- Volatiliser**

Séparer les molécules les unes des autres: on passe de l'état de matière condensée à un état gazeux.

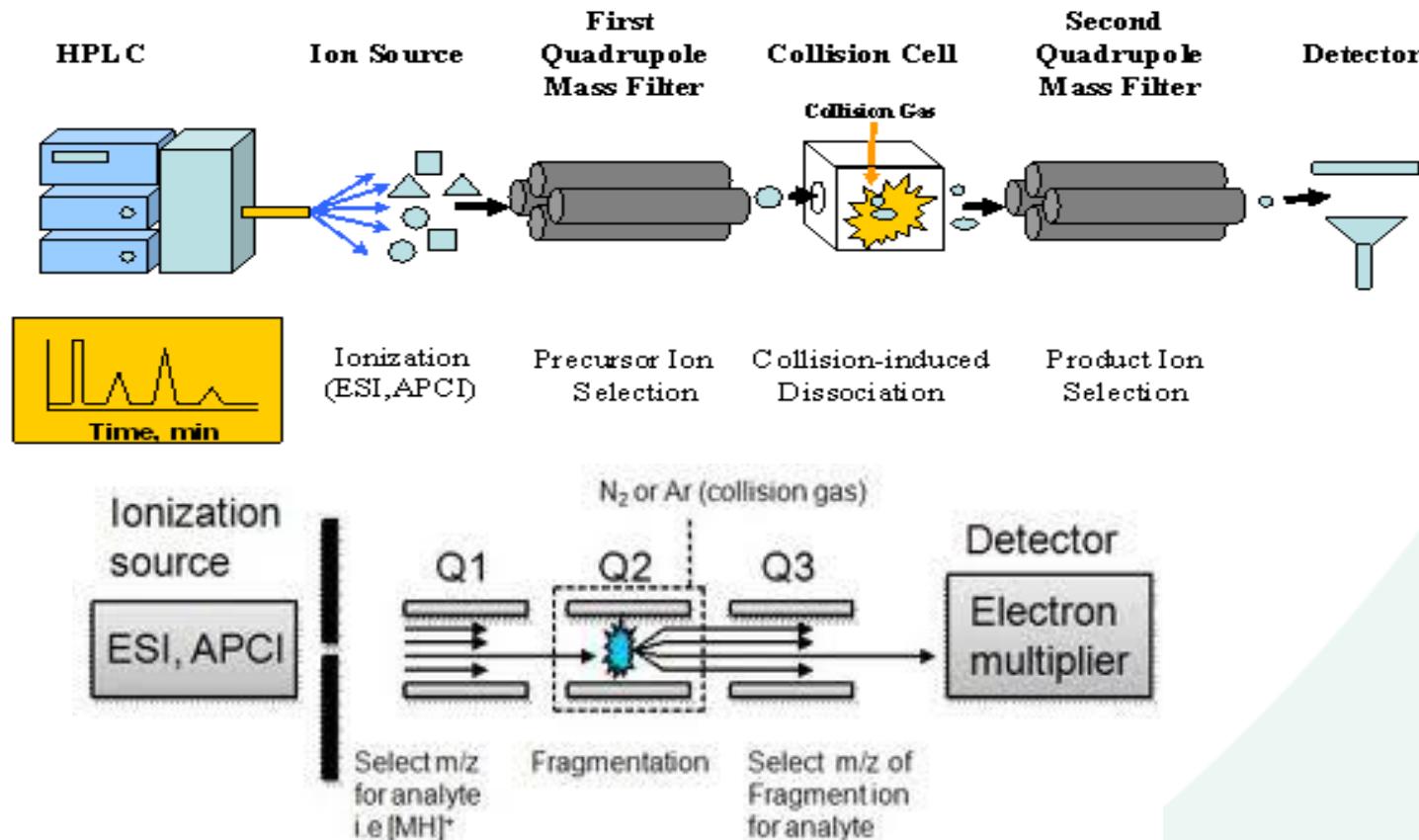
- **2- Ioniser**

Transformer les molécules en ions, car un spectromètre de masse fonctionne grâce à des champs électriques.

- **3- Mesurer les rapports m/z**

La masse moléculaire est calculée à partir du rapport masse (m)/nb de charges (z).

LC-MS/MS



Notre LC-MS/MS TQ5500®

Cortisol



Pourquoi doser le cortisol?

L'hyper-corticisme et l'hypo-corticisme est associé à diverses maladies sévères:

- Maladie de Cushing
- Maladie d'Addison
- Hyperplasie congénitale des surrénales
- Dépression
- Maladie thyroïdienne

Quel milieu utilisé?

- Urine
- Sérum
- Salive
- Cheveux

Cortisol urinaire 24h

Pour

- Non invasif
- Pas influencé par le rythme diurne

Contre

- Récolte de 24h
- Ne peut être utilisé chez les IR
- Cross-reactivity avec les métabolites de stéroïdes

Cortisol sérique

Pour

- Collecte diurne ou après un stress
- Meilleure mesure pour diagnostiquer certain état d'hypercortiscisme

Contre

- La ponction veineuse peut augmenter la libération de cortisol
- Mesure à un moment précis
- Majorité liée à la CBG et à l'albumine (2-3% de libre)
- CBG influencée par la grossesse, les CO, hyperTH (donc conc peut être élevée mais ne reflète pas le cortisol bioactif)
- Méthode pr doser le cortisol libre sont time consuming, tech avancée (ultrafiltration, filtration sur gel...)



Cortisol salivaire

Pour

- Non-invasif
 - ✓ enfant, veines difficiles,...
- Evite la libération induite par le stress
- Collecte à domicile
- Conservation facile
- Mesure du cortisol LIBRE= meilleur indicateur de l'hormone active

Contre

- Mesure à un moment précis
- Interférence possible avec la nourriture, le brossage des dents...
- Volume peut être faible (ex: bouche sèche, impatience, ..)

Cortisol dans les cheveux

Pour

- Biomarqueur de stress chronique (1cm/mois)
- Relativement non-invasif
- Représente seulement le cortisol LIBRE
- Facilement transporté et stocké(RT)

Contre

- Pas de valeurs de référence
- Exposition à des stéroïdes exogènes → contamination
- Mécanisme d'incorporation de cortisol ds les cheveux pas connu. Du sang? Exocrine ou glandes sébacées?

Pré-analytique-Stabilité CTU

RECUEIL DES URINES DE 24 HEURES



Commencez un matin au lever...
Par exemple : 8 heures
Urinez et jetez ces urines...
Notez l'heure : C'est le point de départ des "24 heures".



A partir de ce moment, urinez dans un vase propre et transvasez sans perte dans le récipient remis par le laboratoire.



Recueillez ainsi toutes vos urines de la journée et de la nuit jusqu'au lendemain.

A l'heure de départ notée la veille, urinez une dernière fois et ajouter au récipient.

Rapportez celui-ci, le plus vite possible au laboratoire.

- D'après la Mayo Clinic, le cortisol urinaire est stable 7 jours à température ambiante ou à 4°C et 14 jours à -20°C.

Préanalytique CORS

- Prélèvements sur salivettes spéciales « cortisol »
- Conservation salivette au frigo jusqu'à 48h puis centrifuger et congeler.
- Stabilité de la salive: 7j à 4°C ou RT, 60j à -20°C



Instructions pour le patient

Mode d'emploi pour le recueil de salive avec la Salivette® dans le cadre de la détermination du Cortisol

(a) Stopfen
Stopper
Bouchon

(b) Watterrolle
Swab
Tampon

(c) Einhängegefäß
Suspended insert
Récipient suspendu

(d) Zentrifugengefäß
Centrifuge vessel
Récipient de centrifugation

1ml

1ml

Technische Anweisungen enthalten Technische Anweisungen enthalten Technische Anweisungen enthalten Technische Anweisungen enthalten

Mode d'emploi pour le recueil de salive avec la Salivette® dans le cadre de la détermination du Cortisol

- 1) Procéder au recueil de salive aux heures prescrites par votre médecin. Si aucune indication ne vous a été donnée, il est important de recueillir l'échantillon le matin avant le brossage des dents. Si le recueil doit être effectué pendant la journée, il doit se faire au **minimum 30 minutes** après l'absorption d'aliments solides ou liquides.
- 2) Tenir la Salivette® au bord du récipient suspendu (c) et enlever le bouchon (a). Le bouchon s'enlève plus facilement en imprimant une poussée latérale avec le pouce.
- 3) Sortir le tampon (b) de la Salivette®.
- 4) Recueillir la salive selon les instructions de votre médecin. Si aucune instruction vous a été donnée, mâcher soigneusement le tampon pendant **une minute**. Dans tous les cas, maintenir le tampon dans la bouche jusqu'à ce que vous ne puissiez plus éviter d'avaler la salive produite.
- 5) Remettre le tampon (b) imbibé de salive dans le récipient suspendu (c) et refermer la Salivette® avec le bouchon (a).
- 6) Noter les informations nécessaires sur l'étiquette du tube à centrifuger. Ne pas oublier l'**heure du prélèvement**.
- 7) La Salivette® remplie et fermée est rendue à votre médecin. Si la Salivette® ne peut être rendue de suite ou si plusieurs échantillons de salive sont à prélever, il est conseillé de conserver les Salivettes® remplies dans le réfrigérateur.

Remarque importante : Ne pas utiliser chez l'enfant de moins de 3 ans ou chez des patients qui risquent d'avaler le tampon.

Instructions pour le laboratoire

Mode d'emploi pour le recueil de salive avec la Salivette® dans le cadre de la détermination du Cortisol

(a) Stopfen
Stopper
Bouchon

(b) Watterrolle
Swab
Tampon

(c) Einhängegefäß
Suspended insert
Récipient suspendu

(d) Zentrifugengefäß
Centrifuge vessel
Récipient de centrifugation

1ml

1ml

Technische Anweisungen enthalten Technische Anweisungen enthalten Technische Anweisungen enthalten

Mode d'emploi pour le recueil de salive avec la Salivette® dans le cadre de la détermination du Cortisol

- 1) Sortir le tampon (b) contenu dans l'insert (c) placé dans le tube à centrifuger (d) de la Salivette®.
- 2) Mâcher doucement le tampon (b) pendant une minute afin de produire une quantité suffisante de salive. Mettre le tampon (b) dans la Salivette® et refermer le tube en utilisant le bouchon (a). La température et la durée de stockage dépendent de la stabilité des paramètres à analyser. Si la Salivette® ne peut être rendue de suite ou si plusieurs échantillons de salive sont à prélever, il est conseillé de conserver les Salivettes® remplies dans le réfrigérateur.
- 3) La Salivette® doit être centrifugée **2 minutes à 1000 x g** pour récupérer la salive du tampon.
- 4) Enlever l'insert (c), contenant le tampon (b), du tube à centrifuger (d) et les jeter.
- 5) Fermer le tube à centrifuger (d) avec le bouchon (a). La salive claire est maintenant prête pour les analyses.
- 6) Au dispatching, conserver les Salivettes® entre 2-8°C (8-16h) ou à -20°C (après 16h et week-end).

Attention :

- Ne pas utiliser ce produit chez l'enfant de moins de 3 ans ou chez des patients qui risquent d'avaler le tampon.
- En principe, le volume de salive récupérée devrait être de **1 ml**.

Préparation des échantillons

Cortisol salivaire

Tube en verre: Salive, QC, STD



 STDI



 Méthanol et acétate d'éthyle



Centrifugation



Reprendre puis évaporer sous N₂



Méthanol et eau+acide
formique+acétate d'ammonium

Cortisol urinaire

Centrifuger les urines



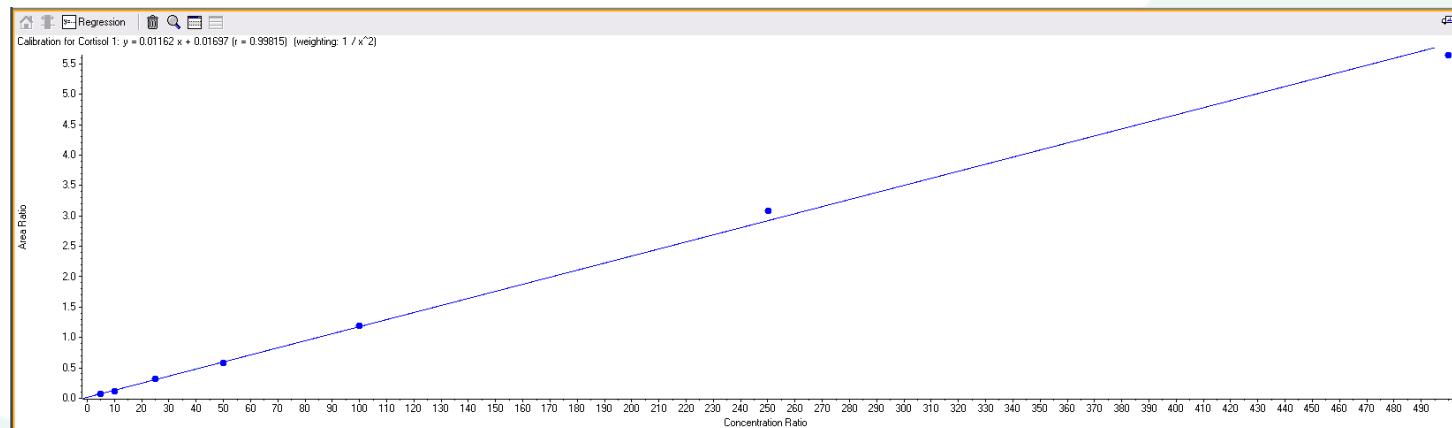
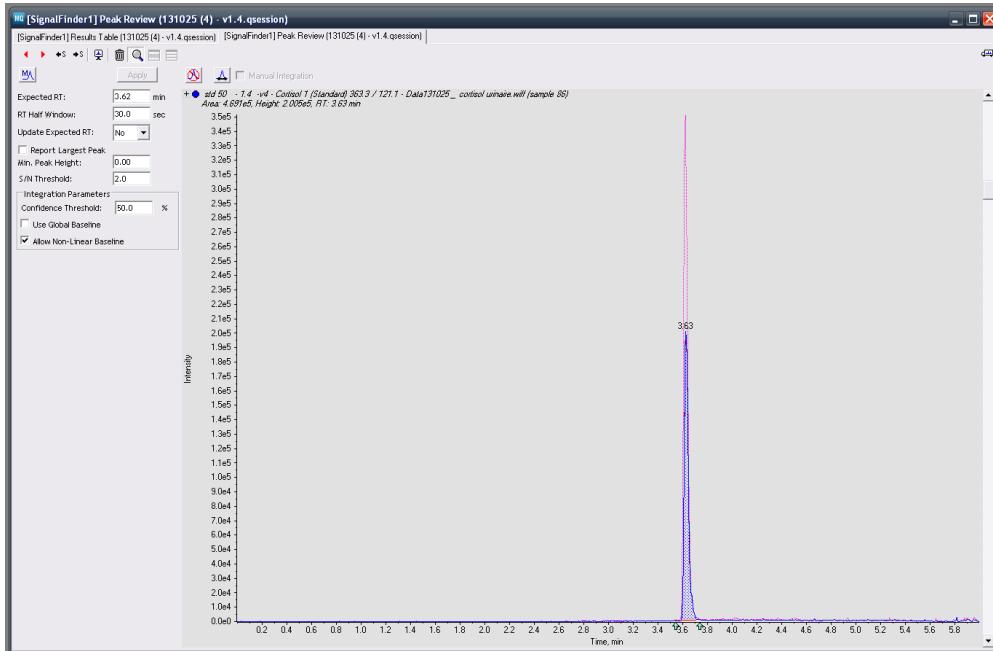
 STDI

 acétate d'ammonium

Caractéristiques LC-MS/MS pour le cortisol

Analyte	MW	Polarity	Transition Type	Analyte Q1 value(m/z)	Analyte Q3 value (m/z)	IS Q1 value (m/z)	IS Q3 value (m/z)
Cortisol	362.2	Positive	Qualifiant	363.3	121.1	367.3	121.1
Cortisol	362.2	Positive	Quantifiant	363.3	97	367.3	121.1

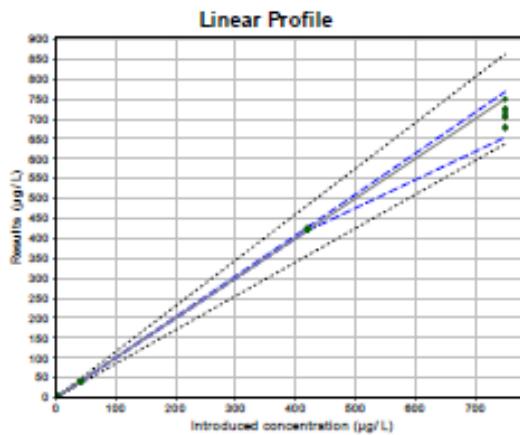
Exemple de chromatogramme pour le CTU



CTU-validation

Répétabilité- Reproductibilité

- Concentration de 1.5-750 µg/24h
- CV %: 0.4-3%
- LOQ: 1.5 µg/24h



Valeurs de référence

Selon la Mayo Clinic :

- 0-2 ans: non établi
- 3-8 ans: 1.4-20 µg/24h
- 9-12 ans: 2.6-37 µg/24h
- 13-17 ans: 4.0-56 µg/24h
- >18 ans: 3.5-45 µg/24h

Selon le Tietz textbook of clinical chemistry:

- 2-11 ans: 1-21 µg/24h
- 12-16 ans: 2-38 µg/24h
- Adult: < 50 µg/24h

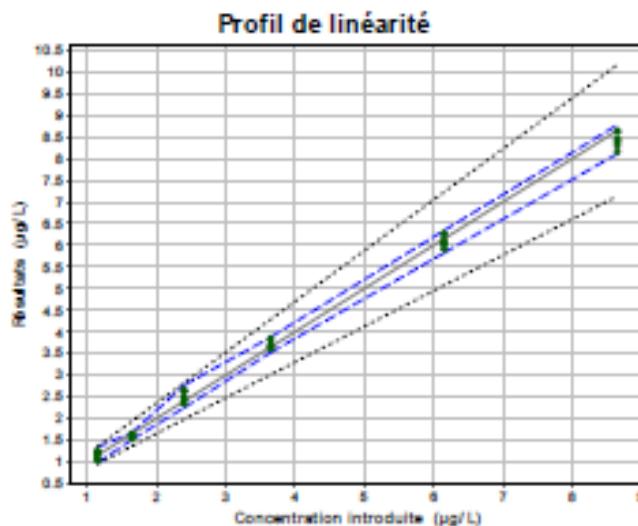
Selon nos essais (n=27)

- 7-47 µg/24h

CORS-validation

Reproductibilité-répétabilité

- Concentration de 1.15-8.65 $\mu\text{g/L}$
- CV%: 1.9-8.1
- LOQ: 1 $\mu\text{g/L}$



Valeurs de référence

Selon la Mayo Clinic :

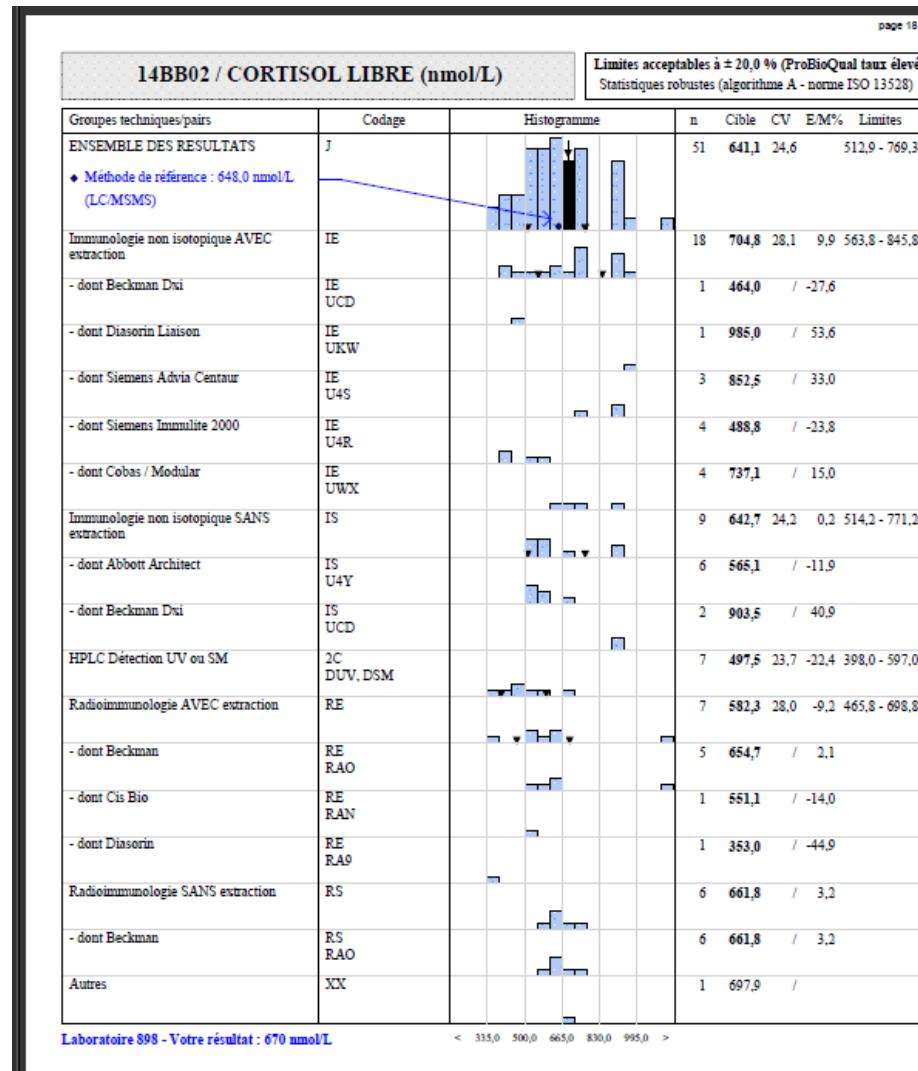
- 7 a.m.-9 a.m.: 1-7.5 $\mu\text{g/L}$
- 3 p.m.-5 p.m.: <4 $\mu\text{g/L}$
- 11 p.m.-midnight: <1 $\mu\text{g/L}$

Normal values are based on 36 donors-ages 0 to 8 years, 46 donors-ages 9 to 17 years, and 102 donors->17 years.
(Mayo Clinic, LC-MS/MS)

Selon le CHU de Liège (n=27):

- 7 a.m.-9 a.m: 0.6-5 $\mu\text{g/L}$
- 11 p.m.-midnight: <0.9 $\mu\text{g/L}$

QCE cortisol PBQ



Interprétation du Cortisol

Augmentation

- Elévation modérée chez les obèses
 - Rythme nycthéméral conservé
- Brûlures graves
- Stress
- Interventions chirurgicales
- Atteintes neurologiques
- Pancréatites
- Etats infectieux aigus
- Dénutrition sévère
- Choc
- Maladie neuropsychiatriques (dépression) → biologique
- CO et grossesse (car transcortine augmente) → biologique

Interprétation du Cortisol

Diminution

- Insuffisance surrénalienne → attention: 20% auront un taux normal
(diminution des 17 cétostéroïdes et 17 OH stéroïdes urinaires lors d'insuffisance surrénalienne primaire et secondaire)
- Hypopituitarisme
- Syndrome de Cushing iatrogène

Aldostérone



Pourquoi doser l'aldostéronone?

HTA avec hypokaliémie

- Hyperaldostéronisme primaire (Syndrome de Conn)
- Hyperadostéronisme secondaire

HTA avec sténose de l'artère rénale

Diminution

- Maladie d'Addison
- Hyperplasie congénitale de la surrénale avec déficit en 21-hydroxylase

Aldostérone en LC-MS/MS?

Pourquoi passer ces analyses en LC-MS/MS ?

- Alternative au RIA
- Sensibilité et Spécificité +++
- Prélèvements très concentrés (aldostérone dans certains prélèvement de cathétérisme surrénalien)
 - Nécessitent une **dilution +++**

Aldo : jusqu'à 40.000 ng/L
dans la veine surrénalienne
considérée après Synacthen !

- Modification très importante de la matrice de l'échantillon (protéines, autres constituants du sérum, viscosité,...)
- Impact sur le dosage par immunoassay
- Pas d'impact sur l'analyse LC-MS/MS

Aldostérone

Pré-analytique

Type d'échantillon :

- Sérum
- Plasma EDTA
- Urine de 24 heures

Dosage urinaire :

→ Préparation de l'échantillon : Hydrolyse acide 18 heures 30°C

Aldostérone 18-glucuronide → Aldostérone

Dosage sérique/plasmatique : importance de la position du patient lors du prélèvement

Position couchée : > 2 heures avant prélèvement !

Position debout : > 1 heure d'activité debout avant prélèvement !

Orthostatisme

➔ 2 à 3 x valeurs en position couchée



Préparation des échantillons

Aldostérone Sérique/Plasmatique

Sérum ou plasma / calibrateur / qc

 standard interne

 MTBE (sous hotte)

Centrifuger

Reprendre la phase organique

Evaporer sous N₂

Reprendre les résidus secs

 Méthanol

Aldostérone urinaire

Urine hydrolysée (HCL)

 standard interne

Validation

- Comparaison de l'aldostérone RIA (Diasorin ®) à la LC-SM/MS(TQ5500, Absciex®) dans le plasma, sérum et l'urine

Design

- 44 échantillons de sérum
 - 28 échantillons d'urine
- de volontaires sains

Design

- Le dosage a été effectué selon la méthode de Holmes and Van Der Gugten

Determination of serum aldosterone by liquid chromatography and tandem mass spectrometry: a liquid–liquid extraction method using the AB SCIEX API-5000 mass spectrometry system

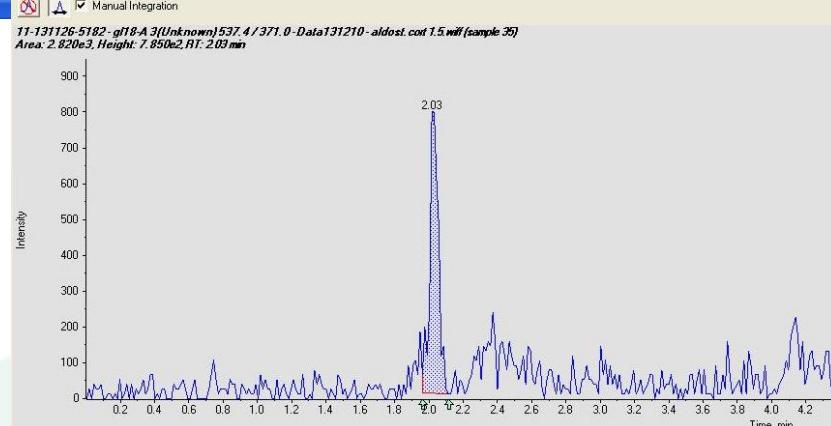
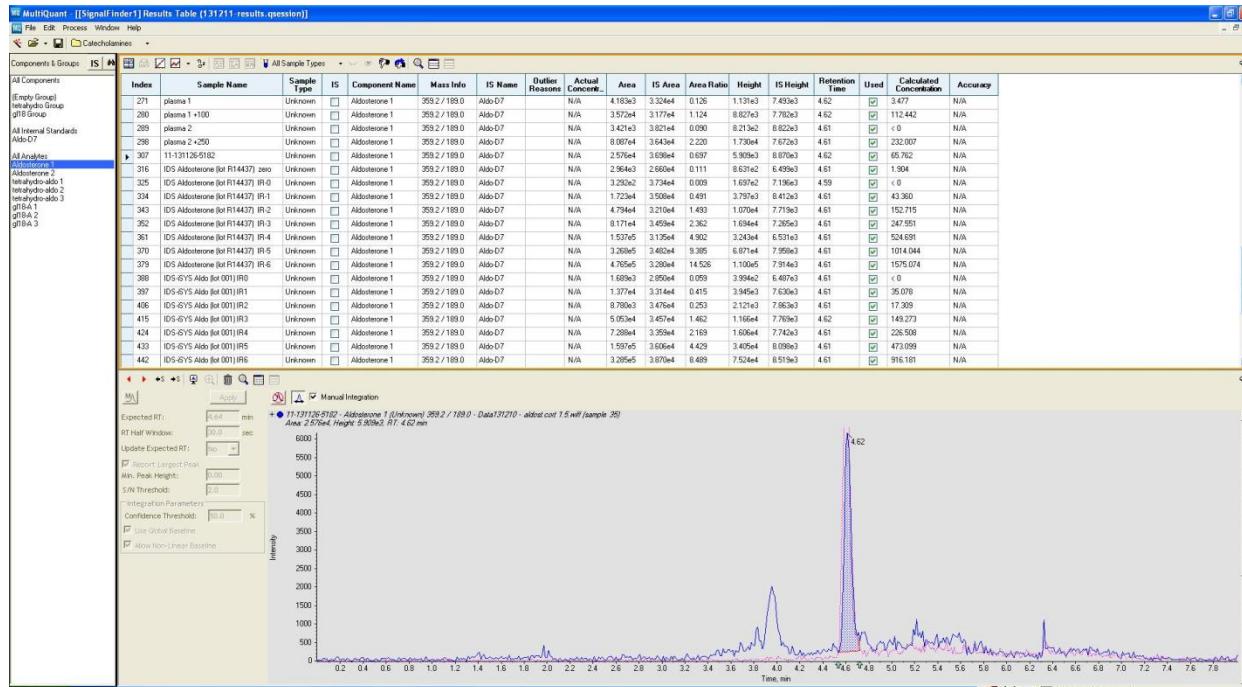
Jessica Grace Van Der Gugten,¹ Joshua Dubland,¹ Hua-Fen Liu,² Alex Wang,² Christine Joseph,¹ Daniel T Holmes^{1,3}

J Clin Pathol. 2012 May;65(5):457-62.

Caractéristiques Aldostérone LC-MS/MS

Analyte	MW	Polarity	Transition Type	Analyte Q1 value(m/z)	Analyte Q3 value (m/z)	IS Q1 value (m/z)	IS Q3 value (m/z)
Aldosterone	360.2	Negative	Qualifiant	359.2	189.2	366.2	338.1
Aldosterone	362.2	Negative	Quantifiant	359.2	331.1	366.2	338.1

Aldostérone en LC-MS/MS



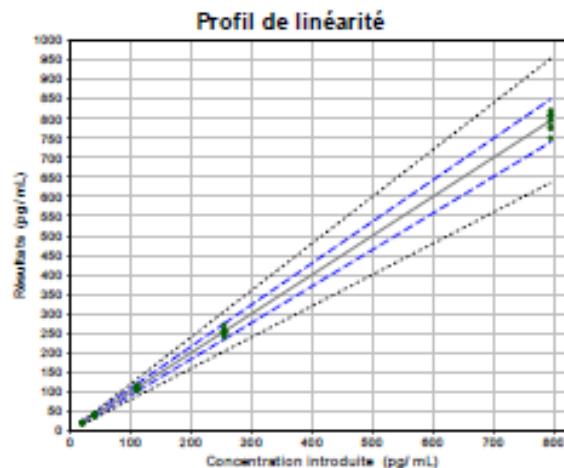
Glucuronide d'aldostérone

Aldostérone validation

Plasma

Reproductibilité-répétabilité

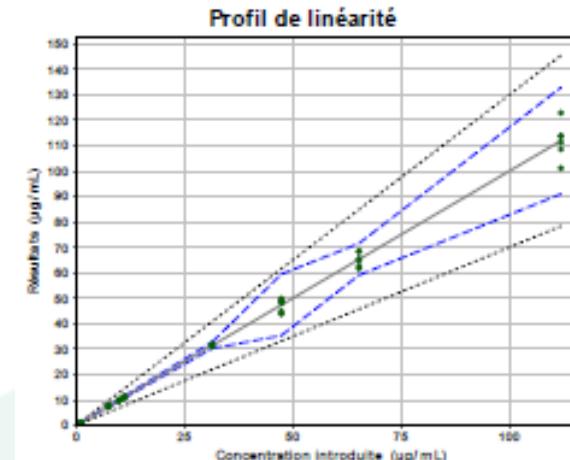
- Concentration de 20-795 ng/L
- CV%:2.8-5.1
- LOQ: 20 ng/L



Urine

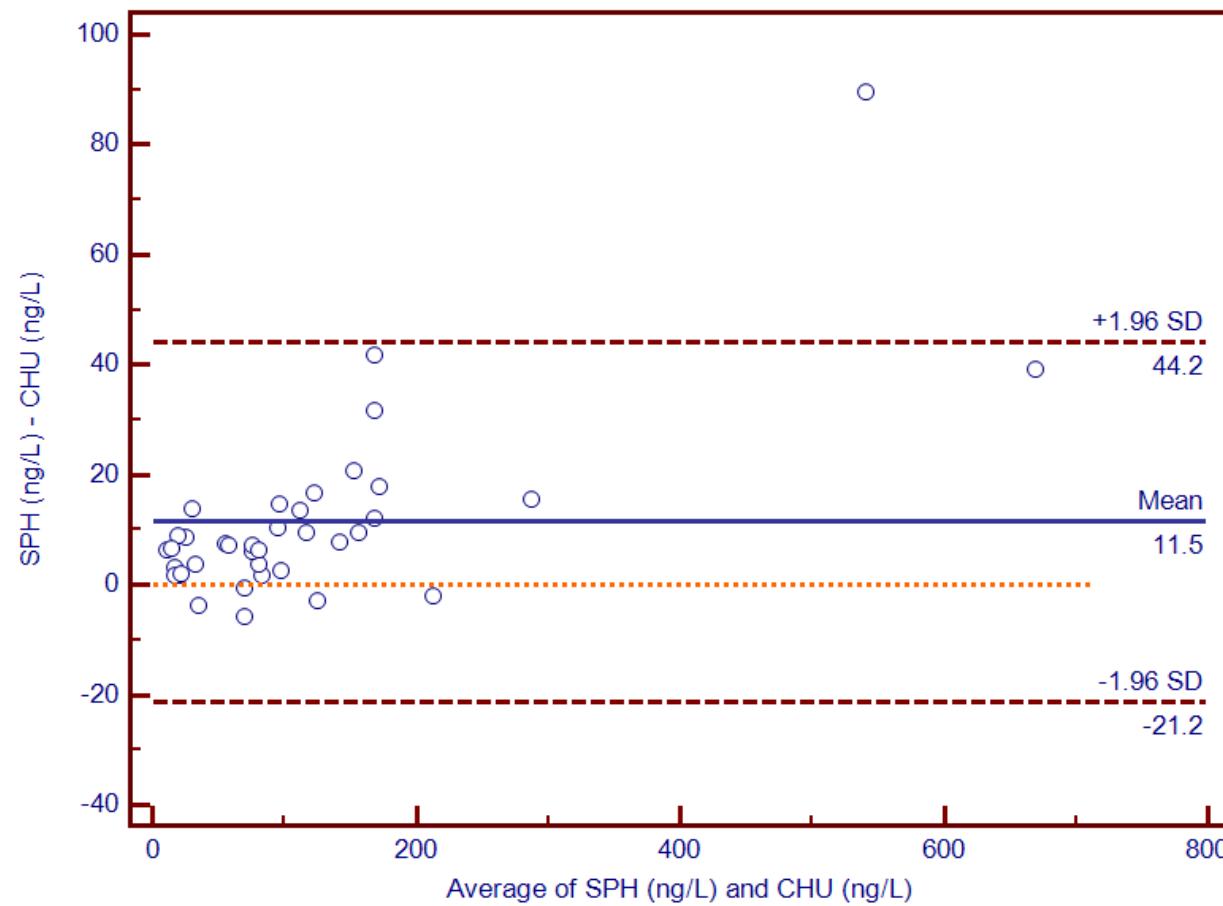
Reproductibilité-répétabilité

- Concentration de 1.1-112 ng/L
- CV%:0.8-6.8
- LOQ: 1.1 ng/L



Comparaison entre Holmes et CHU Liège

LC-MS/MS n=51

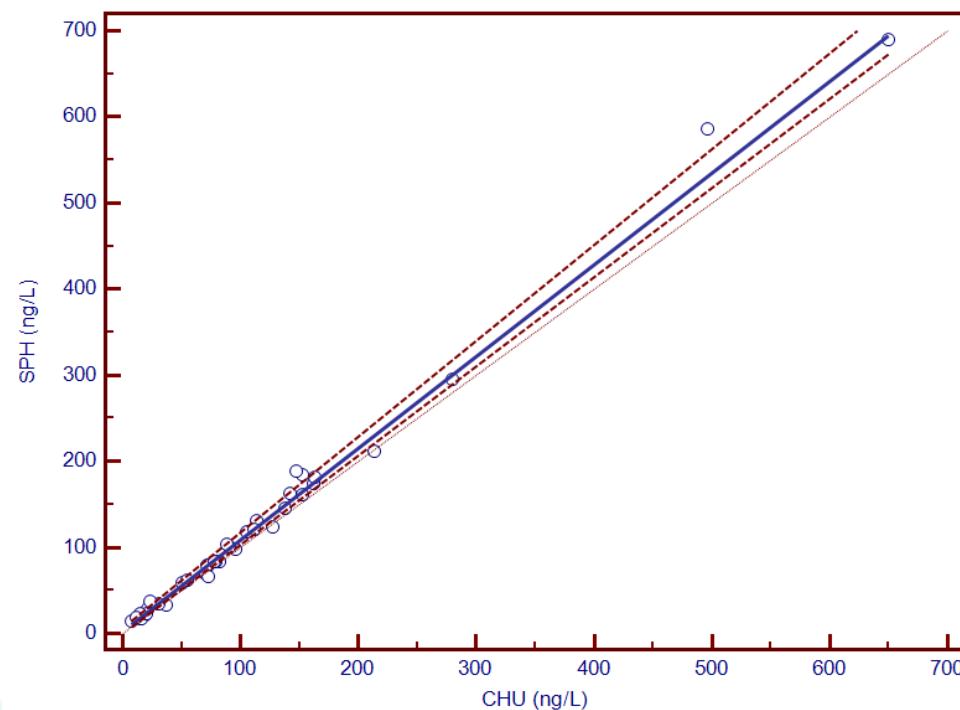


Comparaison entre Holmes et CHU Liège

LC-MS/MS n=51

Regression Equation

$y = 1.985266 + 1.065924 \times$	
Intercept A	1.9853
95% CI	-0.3820 to 5.4957
Slope B	1.0659
95% CI	1.0355 to 1.1146
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P>0.10)

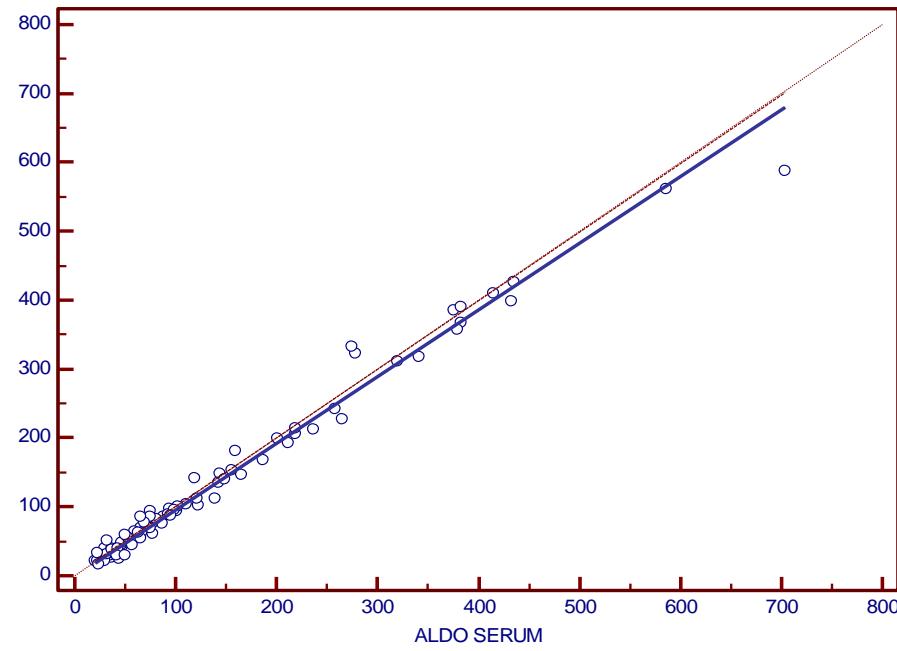
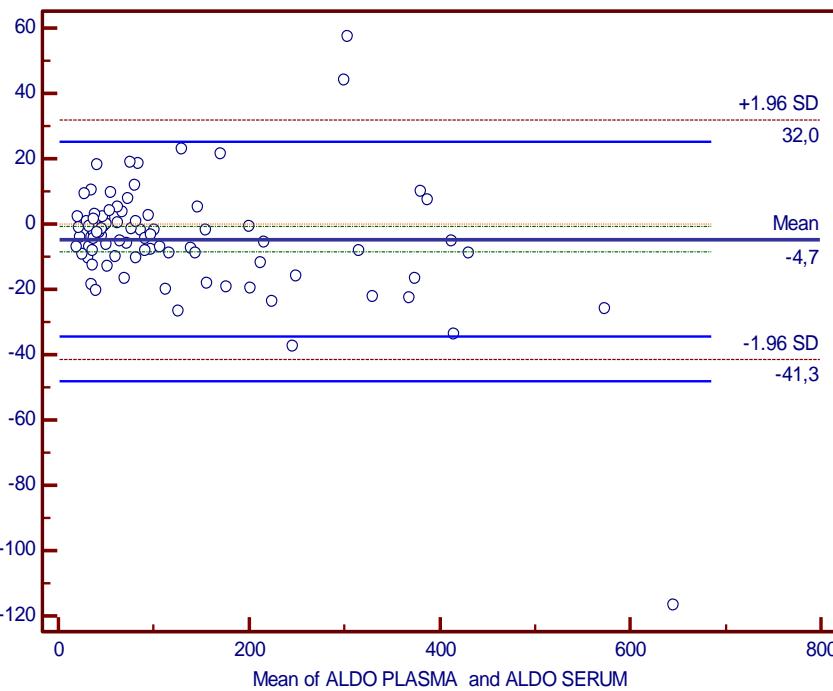


Corrélation sérum-plasma

$$y = -1,049451 + 0,967033 x$$

X= sérum

Y= plasma

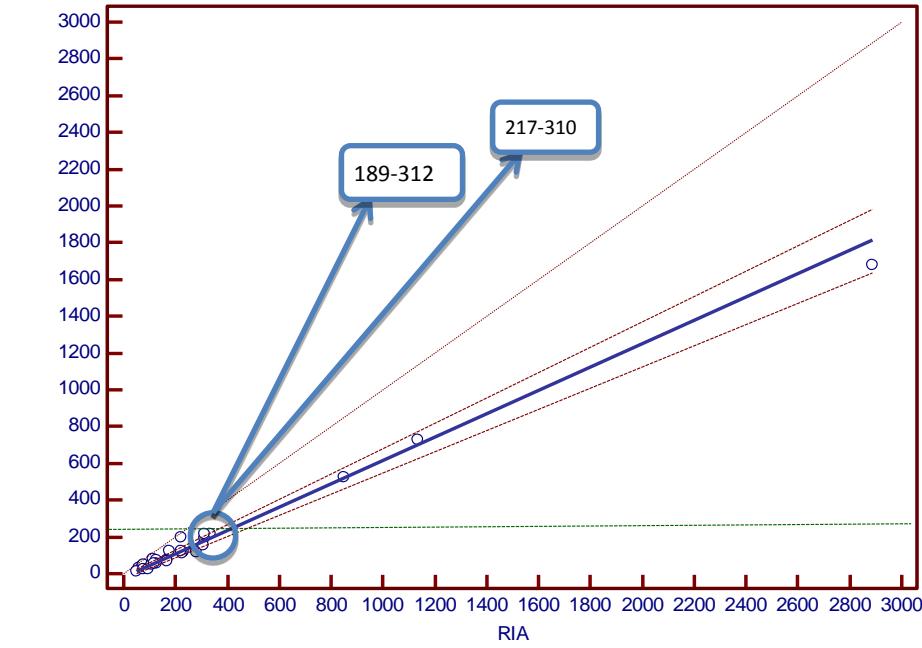
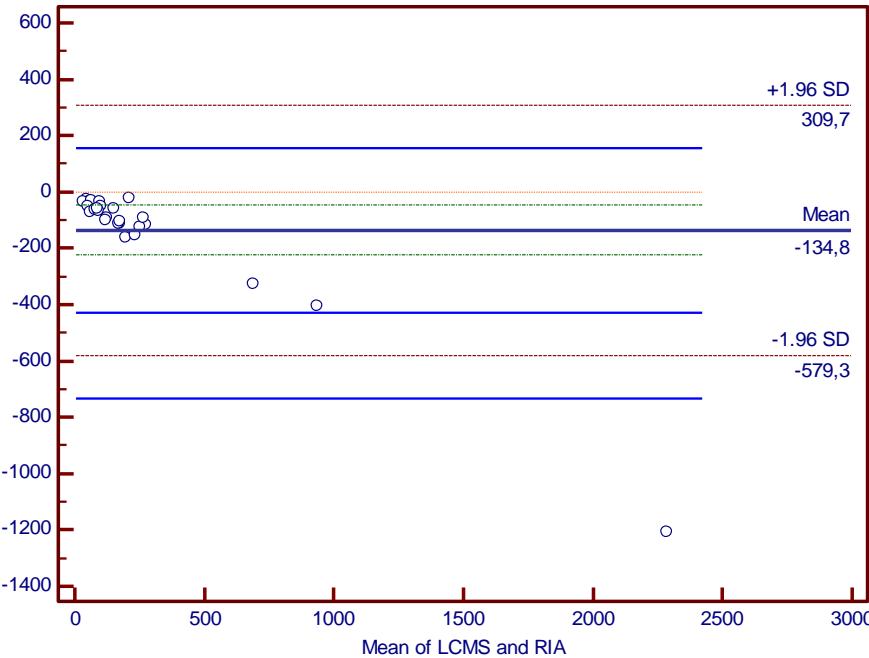


Comparaison RIA-LC-MS/MS

$$y = -16,701835 + 0,635381 x$$

X=RIA

Y=LC-MS/MS



Comparaison RIA-LC-MS/MS

Valeurs de référence

Aldostérone

Sérum/plasma

- Selon la Mayo Clinic:
 - 30 days: 170-1540 ng/L
 - 31 days-11 months: 65-860 ng/L
 - 1-10 years:
 - < or =400 ng/L (supine)
 - < or =1240 ng/L (upright)
 - > or =11 years: < or =210 ng/L (a.m. peripheral vein specimen)
- Selon le CHU de Liege de Liege:
 - 20-229 ng/L (n=74)

Urinaire

- Selon la Mayo clinic:
 - 0-30 days: 0.7-11.0 mcg/24 hours*
 - 31 days-11 months: 0.7-22.0 mcg/24 hours*
 - > or =1 year: 2.0-20.0 mcg/24 hours
- Selon le CHU de Liège
<23 µg/24h (n=36)

Cas clinique

- Mr KHBN (28/12/75)
- Crise de paludisme → IR de garde V et HTA (200/120 mmHg)
- Asthénie et céphalées
- GRF à 6ml/min et Cr= 4.68 g/L
- Protéinurie=3044 mg/L → 700 mg/g Créatinurie

Cas clinique

Dosage d'aldostérone

- RIA>1000 ng/L
 - LCMS-MS pour confirmation
= 65.72 ng/L
- ➔ Mise en évidence de glucuronide d'aldostérone

Précautions: avant de doser l'aldostérone et la rénine

- Arrêt de tout traitement hypotenseur sf inh.calciques et prazosine
- Spironolactone: 6 sem.avt test
- Diurétiques, inh prostaglandines, vasodilatateurs, IEC: 2 sem.avt
- Béta-bloquant: 1 sem.avt
- Normalisation de la volémie plasmatique

Svt patients hypertendus sont hypovolémiques(diurétiques, régimes pauvres en sel)

Pdt sem.précédant le dosage: régime normalement salé+6g NACl/jour

Mesure au 5^{ème} jour de la natriurése: le remplissage volémique est correct si elle dépasse 200mM/24h

Apport de KCl:3-4 g/jour

Interprétation des résultats

Pathologie	Aldostérone	Cortisol	Rénine
Hyperaldostéronisme primaire (Syndrome de Conn)	Elevée	Normal	Basse
Hyperaldostéronisme secondaire	Elevée	Normal	Elevée
Syndrome de Cushing	Basse à normale	Elevé	Basse
Insuffisance surrénalienne (Maladie d'Addison)	Basse	Bas	Elevée

Merci pour votre attention



