

Avaliação rápida dos níveis de cortisol no líquido cefalorraquidiano: Análise de hormônios no líquido cefalorraquidiano em 10 segundos por amostra usando LDTD-MS/MS.

Mégane Moreau, Serge Auger, Pierre Picard, and Jean Lacoursière

PhytroniX Technologies, Québec, Canadá

Palavras-chave: Alto rendimento, Líquido cefalorraquidiano, LDTD-MS/MS

Introdução

Os níveis de cortisol no líquido cefalorraquidiano (LCR) pode orientar o diagnóstico em um paciente com meningite. A meningite bacteriana e a meningite asséptica (viral) não são tratadas da mesma maneira. A meningite bacteriana será tratada com antibióticos, enquanto os mesmos antibióticos não terão efeito na meningite asséptica. Se não for tratada, a meningite pode danificar o cérebro e nervos e pode ser fatal. O diagnóstico rápido do tipo de meningite pode permitir um tratamento rápido e, assim, aumentar a taxa de cura.

O objetivo desta nota de aplicação é desenvolver um método para quantificação ultrarrápida de cortisol no LCR usando a tecnologia LDTD-MS/MS. O sistema LDTD-MS/MS oferece especificidade combinada com análise ultrarrápida para a pesquisa de cortisol no líquido cefalorraquidiano. Para desenvolver esta aplicação, focamos em tornar a preparação da amostra simples e rápida. A análise LDTD-MS/MS é realizada em menos de 10 segundos por amostra.

Fonte de ionização Luxon

O Luxon Ion Source® (Figura 1) é a segunda geração de introdução de amostra e fonte de ionização baseada na tecnologia LDTD® para espectrometria de massa. O Luxon Ion Source® usa laser de diodo acoplado a fibra (Figura 2) para obter uniformidade térmica incomparável, proporcionando mais precisão, exatidão e velocidade. O processo começa com amostras secas que são rapidamente evaporadas usando calor indireto. As moléculas neutras dessorvidas termicamente são transportadas para uma região de descarga corona. A protonação de alta eficiência e a forte resistência à supressão iônica caracterizam esse tipo de ionização e são o resultado da ausência de solvente e da fase móvel. Este processo de dessorção térmica produz um sinal de íon molecular de alta intensidade em menos de 1 segundo de amostra para amostra e permite trabalhar com volumes muito pequenos.



Figura 1 - Luxon Ion Source®



Figura 2 - Esquema da fonte de ionização Luxon

Método de preparação da amostra

Coleta da amostra

Amostras de líquido cefalorraquidiano são coletadas por meio de punção lombar. Para curvas de calibração e amostras de controle de qualidade, a matriz utilizada é o líquido cefalorraquidiano artificial (aLCR).

Tabela 1. Composição do líquido cefalorraquidiano artificial

Compostos	Concentração
NaCl	126 mM
KCl	3 mM
CaCl ₂ · H ₂ O	2 mM

NaH ₂ PO ₄	2 mM
MgSO ₄	2 mM
NaHCO ₃	26 mM
D-glucose	10 mM
BSA	0,4 mg/mL

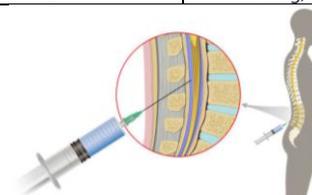


Figura 3. Coleta de líquido cefalorraquidiano

Extração da amostra

- Em um tubo de centrifugação de 1,5 mL, foram adicionados 15 µL de Padrão Interno em metanol.
- Foram adicionados 152 µL de amostras de LCR ou aLCR enriquecido (para curvas de calibração e CQs).
 - Misturados à 1000 rpm/30 segundos.
- Foram adicionados 200 µL de tampão de extração (KH₂PO₄, 1M).
 - Misturados à 1000 rpm/30 segundos.
- Foram adicionados 500 µL de éter metil terc-butílico (MTBE).
 - Misturados à 1000 rpm/30 segundos.
 - Centrifugados (14000 rpm/4 min).
- Em um segundo tubo de borossilicato (10x75 mm), foram transferidos 400 µL do sobrenadante do tubo de centrifugação de 1,5 mL.
 - O sobrenadante foi evaporado até secar, com fluxo de ar suave, em temperatura ambiente.
- Foram adicionados 80 µL de metanol para reconstituir as amostras.
 - Misturados à 1000 rpm/30 segundos.
- Foram adicionados 80 µL de água.
 - Misturados à 1000 rpm/30 segundos.
- Foram colocados 6 µL da mistura em uma placa LazWell™96 CORT.
 - A mistura foi seca por 6 minutos à 40°C.

Parâmetros LDTD®-MS/MS

LDTD

Modelo: Luxon S-960, PhytroniX

Gás carreador: 6 L/min (ar)

Infusão: 1% de ácido fórmico em água a 20 µL/min

Padrão do laser:

- Atraso de início de 1 segundo
- Rampa de 6 segundos para 75% de potência
- 2 segundos de espera

MS/MS

Modelo do MS: QTRAP 550, Sciex

Tempo de escaneamento: 50 msec

Ionização: APCI

Método de análise: Modo de ionização negativa

Tabela 2 – Transições MRM para Luxon-MS/MS

Composto	Transição	CE	DP
Cortisol	407,0 → 331,1	-24	-80
Cortisol-d ₆	413,0 → 335,0	-24	-80

Resultados e Discussão

Linearidade

As amostras foram adicionadas de 5 à 100 ng/mL em líquido cefalorraquidiano artificial. Soluções de trabalho padrão (10X) foram preparadas em metanol.

O seguinte critério de aceitação foi utilizado:

- Cada curva de calibração, para cada execução, deveria ter um coeficiente de correlação (r) maior que 0,99.

Tabela 3. Coeficiente de correlação obtido para 6 execuções

Execução	Equação (Y = a X + b)	Coefficiente de correlação (r)
1	Y = 0,00722 X - 1,06061·10 ⁻⁴	0,99551
2	Y = 0,00528 X + 0,00232	0,99202
3	Y = 0,00578 X + 0,00721	0,99200
4	Y = 0,01351 X - 0,00355	0,99522
5	Y = 0,00906 X + 0,01528	0,99446
6	Y = 0,00923 X + 0,00891	0,99648

Precisão e Exatidão

Cada controle de qualidade foi utilizado para validar a precisão e a exatidão do método. As concentrações dos controles de qualidade foram de 15 ng/mL para QCB (baixo), 50 ng/mL para QCM (médio) e 75 ng/mL para QCA (alto). A área do pico em relação à razão do padrão interno (PI) foi utilizada para normalizar o sinal. As extrações replicadas foram depositadas em uma placa LazWell™CORT e secas antes da análise.

Os seguintes critérios de aceitação foram utilizados:

- Cada controle de qualidade não deveria exceder 15%CV para pelo menos 66,6% das amostras.
- Cada controle de qualidade não deveria exceder 15% de viés para pelo menos 66,6% das amostras.

Para experimentos de precisão e exatidão intra-execução, um conjunto de controle de qualidade fortificado em aLCR foi extraído e analisado em sextuplicata. A Tabela 4 mostra que os resultados de intra-execução, %CV e %Viés obtidos foram menores que 15% para cada concentração analisada. Para o experimento de precisão entre execuções, cada conjunto de amostras fortificadas foi analisado em sextuplicata em seis diferentes execuções. A Tabela 5 mostra os resultados de precisão e exatidão entre execuções. A exatidão e a precisão ficaram abaixo de 15%.

Tabela 4 - Resultados de precisão e exatidão intra-execução

Cortisol	QCB	QCM	QCA
Conc (µg/mL)	15	50	75
N	6	6	6
Média (µg/mL)	15,2	49,3	81,0
%CV	8,3	12,9	7,6
%Viés	1,4	1,5	8,0

Tabela 5 - Resultados de precisão e exatidão entre execuções

Cortisol	QCB	QCM	QCA
Conc (µg/mL)	15	50	75
N	30	30	30
Média (µg/mL)	105,4	52,1	75,8
%CV	12,2	10,1	10,7
%Viés	2,8	4,3	1,1

Estabilidade úmida de extratos de amostra

Após a extração, a amostra extraída foi transferida para um recipiente fechado mantido a 4°C. Após 1 dia, as amostras extraídas foram colocadas em uma placa LazWell™CORT, secas e analisadas. A precisão e a exatidão das amostras estão relatadas nas Figura 4A e

4B. Todos os resultados estão dentro da faixa de critérios aceitáveis para 1 dia a 4°C.

Estabilidade seca de amostras detectadas em LazWell™

As amostras extraídas foram colocadas em uma placa LazWell™CORT, secas e mantidas em temperatura ambiente por 3 horas antes da análise. Os resultados de precisão e exatidão estão relatados nas Figura 4A e 4B, respectivamente. Todos os resultados estão dentro da faixa de critérios aceitáveis por 3 horas em temperatura ambiente.

Os seguintes critérios de aceitação foram utilizados para estabilidade úmida e seca:

- Cada controle de qualidade não deveria exceder 15%CV para pelo menos 66,6% das amostras.
- Cada controle de qualidade não deveria exceder 15% de viés para pelo menos 66,6% das amostras.

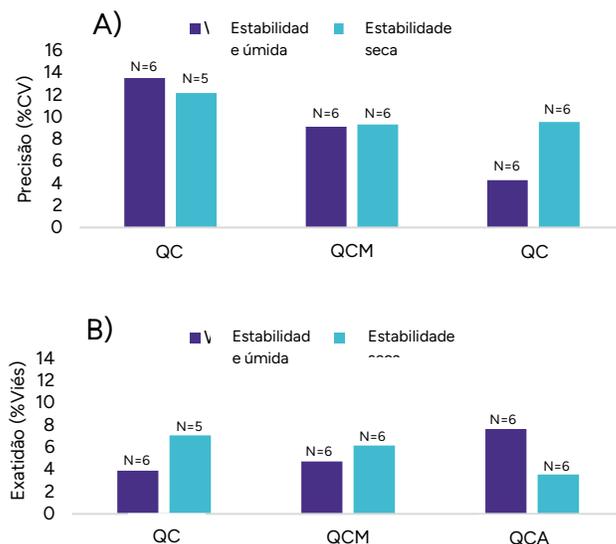


Figura 4 – Avaliação da estabilidade úmida e seca: A) Resultados de precisão B) Resultados de exatidão

Validação multi-matriz

Seis diferentes matrizes de líquido cefalorraquidiano foram analisadas por LDTD-MS/MS e por LC-MS/MS. As amostras foram extraídas usando o método mencionado anteriormente. Os resultados da validação multi-matriz são mostrados na Tabela 6.

O seguinte critério de aceitação foi utilizado:

- A diferença entre os resultados de LC-MS/MS e LUXON-MS/MS deveria ser inferior a 20% de diferença.

A diferença (em %) entre os dois métodos instrumentais foi menor que 10% para todas as seis matrizes.

Tabela 6 - Validação multi-matriz para colesterol (n=1)

	LUXON-MS/MS	LC-MS/MS	% Diferença
Matriz 1	9,7	9,7	0
Matriz 2	7,7	8,0	3
Matriz 3	18,1	17,5	3
Matriz 4	8,8	8,6	2
Matriz 5	12,8	12,1	5
Matriz 6	12,2	11,6	5

Conclusão

O Luxon Ion Source® combinado com um sistema de espectrometria de massa, Sciex QTRAP 5500, permite a quantificação ultrarrápida (10 segundos por amostra) de cortisol no líquido cefalorraquidiano utilizando um método simples de preparação de amostra para diagnóstico de meningite bacteriana ou asséptica.