

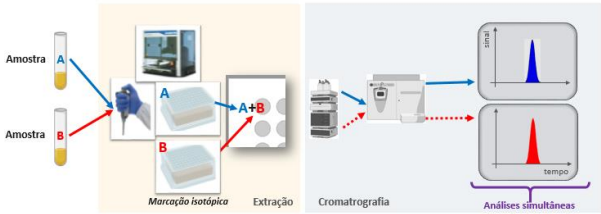
Uma nova era para dosagem de cortisol salivar em análises clínicas: o uso da multiplexação isotópica

Autores: Vanessa Velazquez Viegas , Rodrigo Andrade Schuch, Adriana Lebkuhen Martins, Nathalya Cristina Lavelle, Valdemir Melechco Carvalho, Karina H.M. Cardozo.

Introdução: O cortisol é o principal glicocorticoide produzido pelas glândulas adrenais. Obedece a um ritmo circadiano, sendo mais elevado pela manhã e mais baixo à noite. A determinação do cortisol salivar reflete melhor a quantidade de cortisol livre e está indicada principalmente no diagnóstico de hipercortisolismo. A coleta de saliva apresenta algumas vantagens intrínsecas por se tratar de uma coleta simples e não-invasiva com boa estabilidade o analito. Ao mesmo tempo, a saliva é uma matriz biológica mais heterogênea que o soro ou a urina necessitando de uma padronização rigorosa nas fases pré-analítica e analítica. A dosagem de cortisol em saliva apresenta boa correlação com a medida de cortisol livre em soro para a aplicação clínica.

Objetivo: Para quantificação de tal metabolito para uso em diagnóstico clínico, foi desenvolvido e validado um método automatizado utilizando a técnica de multiplexação isotópica.

Princípio da metodologia de multiplexação química:

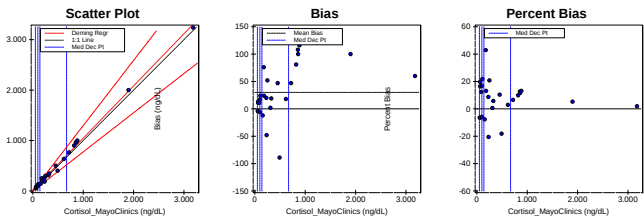


Materiais e método: Todas as etapas do protocolo de extração foram automatizadas com o auxílio de manipulador de líquidos robótico. Às amostras de saliva foi adicionado padrão interno marcado isotopicamente e a mistura submetida à extração líquido-líquido com solvente orgânico. Após a transferência e evaporação do solvente, um grupo de amostras foi convertido a oximas, e um outro em oximas com deutérios. As amostras com diferentes marcações foram combinadas e analisadas por LC-MS/MS utilizando o modo de monitoramento de reações múltiplas no modo positivo.

Resultados: Os seguintes parâmetros de validação foram analisados no método desenvolvido: precisão, exatidão, limites de quantificação, linearidade, arraste e interferentes (contribuição entre as marcações leve e pesada). Foram seguidos os procedimentos recomendados pelo CLIA e NCCLS. Os dados foram analisados por meio do *software* EP Evaluator v12.

Exatidão : Não foi observado presença de erros na comparação com o laboratório de referência (Mayo Clinic). Quando avaliado os programas de proficiência (CAP SALC) foi observado um bias inferior a 9% em relação ao provedor.

Linearidade: Método se mostrou linear até 4000 ng/dL.

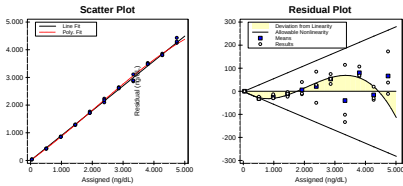


Regression Analysis

	Deming	Regular
Slope	1,035 (1,009 to 1,061)	1,033 (1,007 to 1,059)
Intercept	12,3 (-9,8 to 34,4)	13,3 (-8,8 to 35,4)
Std Err Est	43,5	43,5

95% Confidence Intervals are shown in parentheses

CLSI EP6 Linearity



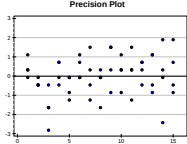
Limite de quantificação: O limite de quantificação estimado para um CV de 20% foi inferior a 17 ng/dL.

Precisão: Três níveis foram avaliados e apresentação variação menor que 8%.

Nível 1

Alternate Precision

Precision Estimate User's Concentration: 34,2									
	Within Run	Between Run	Between Day	Total	Medically Required	Value (SD%)	Pass/Fail		
Std. Dev	2,4	0,0	0,0	2,5	2,7	3,1	Pass		
% CV	7,1	0,0	2,2	7,5	8,0				
n	48	—	—	57					

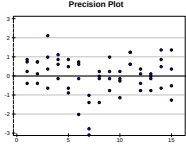


Outlier Rejection Criteria				
SD	2,5 (calculated)			
Multiplier	5,5			
Max difference between replicates	0,05			
Preliminary estimate of precision				
Mean	34,3	CV	8,1%	
n	29	N	20	
Results				
30	31	36	37	35
38	27	24	27	
39	31	30	39	35
34	32	32	40	35

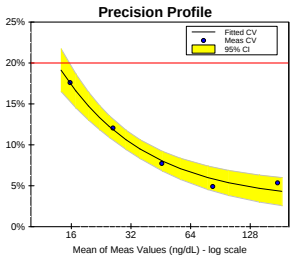
Nível 2

Alternate Precision

Precision Estimate User's Concentration: 357,2									
	Within Run	Between Run	Between Day	Total	Medically Required	Value (SD%)	Pass/Fail		
Std. Dev	6,5	0,0	4,7	8,0	10,0	19,5	Pass		
% CV	3,1	0,0	2,3	3,9	8,0				
n	48	—	—	42					



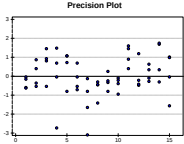
Outlier Rejection Criteria				
SD	12,2 (calculated)			
Multiplier	5,5			
Max difference between replicates	0,1			
Preliminary estimate of precision				
Mean	357,2	CV	5,3%	
n	20	N	19	
Results				
229	229	263	237	254
254	229	254	237	253
250	223	229	241	231
229	244	225	230	



Nível 3

Alternate Precision

Precision Estimate User's Concentration: 787,4									
	Within Run	Between Run	Between Day	Total	Medically Required	Value (SD%)	Pass/Fail		
Std. Dev	30,4	0,0	15,0	34,2	61,4	71,2	Pass		
% CV	4,0	0,0	2,0	4,5	8,0				
n	45	—	—	51					



Outlier Rejection Criteria				
SD	50,2 (calculated)			
Multiplier	5,5			
Max difference between replicates	325,6			
Preliminary estimate of precision				
Mean	787,3	CV	5,3%	
n	16,2	N	16	
Results				
881	827	880	885	873
882	1005	840	871	861
883	806	871	865	833
881	831	880	813	

Conclusão: A estratégia desenvolvida combinou etapas de verificação de rastreabilidade ao longo de todas as etapas de análise das amostras. O método apresentou imprecisões inferiores a 8% para três diferentes níveis de concentração dentro da faixa clinicamente relevante com linearidade até 4000 ng/dL e limite de quantificação de 20 ng/dL. Como exatidão foi utilizado amostras do programa de proficiência CAP as quais apresentaram tendências inferiores a 10%. Os dados foram avaliados e aprovados de acordo com os erros permitidos no CLIA. A técnica de multiplexação isotópica proporcionou um aumento de produtividade de 2x para o diagnóstico clínico com a manutenção da qualidade analítica e de segurança do paciente.