

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

“Validazione di un metodo LC-MS/MS per la determinazione del
17-idrossiprogesterone sierico”

RELATORE: Ch.ma Prof.ssa Daniela Basso

CORRELATORE: Dott.ssa Giorgia Antonelli

Laureando: Francesco Veronese

Matricola: 1219653

Anno Accademico: 2021/2022

ABSTRACT

Introduzione. Il 17-idrossiprogesterone (17-OHP) è un ormone steroideo, precursore del cortisolo che deriva dal colesterolo. La misurazione del 17-OHP può essere utilizzata per la ricerca, diagnosi e monitoraggio della sindrome surrenale-genitale congenita (CAH) e sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) e nella diagnosi di tumori surrenalici androgeno-secerenti. Tradizionalmente, i livelli di 17-OHP sierici vengono determinati con test immunometrici manuali e più recentemente automatizzati ma che presentano una bassa specificità analitica e di conseguenza una inaccuratezza diagnostica. L'utilizzo della cromatografia liquida (HPLC) accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) permette di avere un'elevata specificità analitica.

Lo scopo di questa tesi è ottimizzare la procedura di preparazione del campione di un metodo "home-made" LC-MS/MS per la determinazione del 17-OHP sierico in modo da renderla implementabile su un preparatore automatico e di poterlo quindi attivare nella routine di laboratorio. Questo metodo poi deve essere validato secondo le linee-guida internazionali, rendendolo conforme allo Standard Internazionale di accreditamento per i laboratori medici ISO 15189:2012.

Materiali e metodi. È stata studiata una procedura di preparazione del campione che prevede una fase iniziale di precipitazione proteica (PP) e una seconda fase di estrazione in fase solida (SPE). Questa procedura è stata inizialmente condotta con cartucce Oasis HLB 1 mL (Waters, USA) per poi utilizzare le piastre SPE Oasis HLB 96-well μ Elution Plate (Waters, USA). I campioni preparati sono stati analizzati sullo strumento LCMS-8060 (Shimadzu, Japan) utilizzando la colonna ACQUITY UPLC HSS T3, 100Å, 1.8 μ m, 2.1 mm X 100 mm (Waters). Il metodo è stato validato secondo le principali linee guida internazionali (CLSI C50-P, CLSI C62, FDA 2018) per i parametri di range di misura analitico, specificità, limite di quantificazione, imprecisione, inesattezza, effetto matrice, comparabilità con il metodo immunometrico e stabilità del campione.

Risultati. Le prestazioni analitiche ottenute dalle prove di validazione soddisfano i criteri di accettabilità richiesti dalle linee-guida internazionali. La procedura di preparazione del campione ottimizzata ha migliorato la risoluzione dei picchi cromatografici, il rapporto segnale/rumore di fondo e il limite di quantificazione. Il metodo sviluppato non risulta né comparabile né correlato con il metodo immunometrico in routine.

Conclusioni. La procedura di preparazione del campione del metodo "home-made" LC-MS/MS per la determinazione dei livelli sierici di 17-OHP è stata ottimizzata per renderla automatizzabile e quindi per poterla implementare nella routine di laboratorio. Il metodo è stato sottoposto a rigorosa

validazione secondo le principali linee-guida internazionali e le prestazioni analitiche sono risultate soddisfacenti in base allo scopo d'uso del test.

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Ormoni steroidei.....	1
1.2. 17-idrossiprogesterone.....	2
1.3. Utilità clinica della determinazione del 17-OHP	2
1.3.1. Iperplasia Surrenalica Congenita (CAH)	3
1.3.2. Sindrome dell’ovaio policistico (PCOS)	4
1.4. Determinazione del 17-OHP: metodi analitici.....	4
1.4.1. Metodi immunometrici	4
1.4.2. Metodi in spettrometria di massa	5
1.6. Validazione di metodo home made LC-MS/MS.....	10
1.6.1. ISO 15189 e linee guida internazionali.....	10
1.6.2. Parametri di prestazioni analitiche	11
1.6.2.1. Range di misura analitico e linearità.....	11
1.6.2.2. Specificità analitica	11
1.6.2.3. Sensibilità analitica	11
1.6.2.4. Accuratezza, esattezza e stima dell’inesattezza	12
1.6.2.5. Imprecisione	13
1.6.2.6. Effetto matrice	13
1.6.2.7. Stabilità.....	14
1.6.2.8. Comparabilità tra due metodi	14
2. SCOPO	15
3. MATERIALI E METODI	17
3.1. Campioni biologici	17
3.2. Standard, Standard Interno e 11 deossicorticosterone.....	17
3.3. Controlli di qualità.....	17
3.4. Reagenti	18
3.5. Strumentazione.....	18
3.6. Altri materiali	18
3.7. Metodo LC-MS/MS: condizioni strumentali	19
3.7.1. Condizioni cromatografiche	19
3.7.2. Condizioni dello spettrometro di massa.....	20
3.8. Procedura di preparazione del campione	22
3.9. Analisi statistica	23
3.10. Procedura di validazione del metodo.....	24
3.10.1. Range di misura analitico	24
3.10.2. Specificità: separazione dell’11-DOC	24

3.10.3. Limite di quantificazione	24
3.10.4. Inesattezza	24
3.10.5. Stima dell'inesattezza.	25
3.10.6. Imprecisione	25
3.10.7. Effetto matrice	25
3.10.8. Stabilità dei campioni processati	26
3.10.9. Stabilità pre-analitica	26
3.10.10. Valutazione di matrici biologiche diverse.....	26
3.10.11. Comparabilità tra metodi.....	26
4. RISULTATI.....	27
4.1. Analisi cromatografica	27
4.2. Ottimizzazione del metodo e comparabilità tra le preparative in colonnina e in micropiastra	27
4.3. Prove di validazione	29
4.3.1. Curva di calibrazione e range di linearità	29
4.3.2 Specificità.....	30
4.3.3. Limite di quantificazione	30
4.3.4. Inesattezza	31
4.3.5. Stima dell'inesattezza	31
4.3.6. Imprecisione	32
4.3.7. Effetto matrice	33
4.3.8. Stabilità dei campioni processati	33
4.3.9. Stabilità pre-analitica	33
4.3.10. Valutazione di matrici biologiche diverse.....	34
4.3.11. Comparabilità tra metodi	35
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	37
6. BIBLIOGRAFIA	41

1. INTRODUZIONE

1.1. Ormoni steroidei

Gli ormoni steroidei sono messaggeri chimici in grado di influenzare l'attività di cellule bersaglio. Questa classe di molecole è prodotta a partire dal colesterolo con cui condivide la caratteristica struttura tetraciclica del ciclopentanoperidrofenantrene.

Si dividono in 5 classi e sono prodotti da surrene e gonadi. Nella corteccia della ghiandola surrenale vengono sintetizzate a partire dal colesterolo due classi di ormoni steroidei: nella zona glomerulosa i **mineralcorticoidi** come l'aldosterone, che controllano il riassorbimento di ioni inorganici (Na , Cl^- e HCO_3^-) da parte del rene, e nella zona fasciolata del surrene si producono i **glucocorticoidi** come il cortisolo, che contribuiscono a regolare la glicogenesi e a ridurre la risposta infiammatoria e nella zona reticolare l'androstenedione che è il precursore degli ormoni steroidei sessuali [1].

Gli ormoni sessuali sono prodotti nelle gonadi maschili e femminili e nella placenta. Comprendono il **progesterone**, che regola il ciclo riproduttivo femminile, gli **androgeni** (come il testosterone) e gli **estrogeni** (come l'estradiolo, E2), che influenzano lo sviluppo delle caratteristiche sessuali secondarie nei maschi e nelle femmine. In Figura 1. è rappresentata la via biosintetica degli ormoni steroidei.

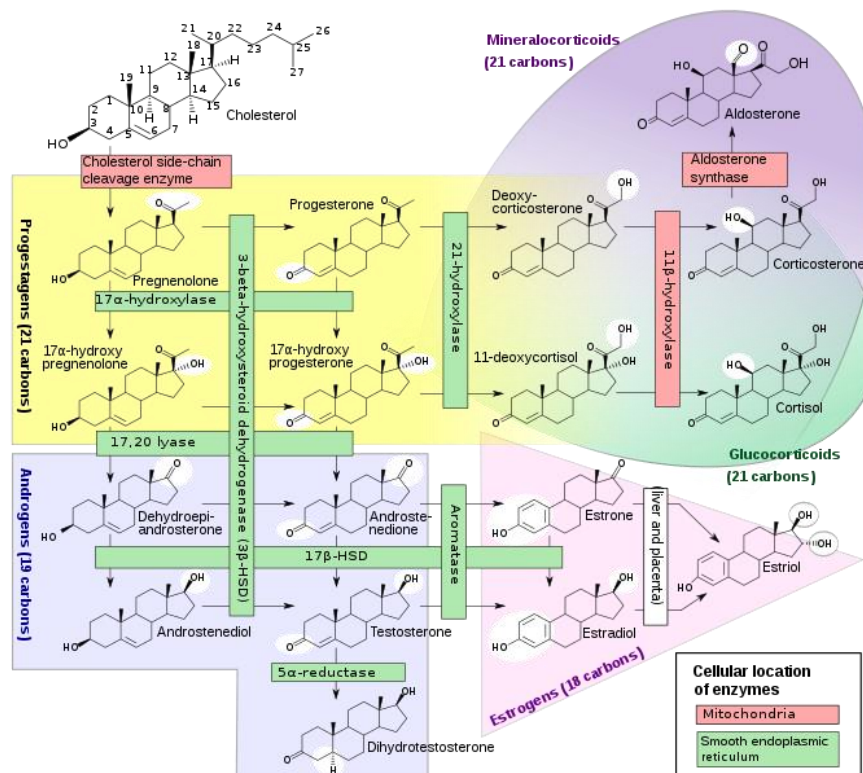


Figura 1. Steroidogenesi con enzimi e intermedi, tratta da Häggström e Richfield [2].

1.2. 17-idrossiprogesterone

L'ormone 17-idrossiprogesterone (17-OHP) è un intermedio metabolico, precursore di corticosteroidi, androgeni ed estrogeni. Può derivare sia dal progesterone, in cui viene ossidato il carbonio in posizione 17 dal CYP17, che dal pregnenolone, dove viene idrossilato dall'enzima 17 α -idrossilasi a 17-idrossipregnenolone, che viene convertito in 17-idrossiprogesterone via 3 β -HSD [3].

Successivamente il 17-OHP viene convertito in 11-deossicortisolo, mediante la 21-idrossilasi e in seguito in cortisolo, tramite la 11 β -idrossilasi. Il cortisolo viene rilasciato costantemente in quantità variabili, ma i livelli elevati vengono rilasciati durante i periodi di stress fisico o emotivo. Il cortisolo è importante anche per la regolazione del metabolismo e del sistema immunitario. Una carenza di cortisolo può verificarsi nelle persone che non dispongono degli enzimi appropriati, il che può portare a un accumulo di 17-OHP nel sangue [4].

1.3. Utilità clinica della determinazione del 17-OHP

La determinazione del 17-OHP può essere impiegata per:

- Screening neonatale della Iperplasia Surrenalica Congenita (CAH);
- Monitoraggio della terapia della CAH;
- Diagnosi differenziale tra CAH “late onset” e Sindrome dell’ovaio policistico (PCOS);
- Valutazione degli iperandrogenismi;
- Valutazione della pubertà precoce;
- Diagnosi e lateralizzazione di tumori androgeno-secerntenti e follow-up post chirurgico.

Le sue concentrazioni hanno un chiaro ritmo circadiano (valori più alti al mattino) e nella donna variano in relazione alle fasi del ciclo (picco coincidente con il picco LH e aumento nella fase luteinica). I valori di riferimento variano con il sesso e con l’età (vedi Tabella I.).

Tabella I. Intervalli di Riferimento per il 17-OHP sierico adottati dalla UOC Medicina di Laboratorio della Azienda Ospedale-Università Padova.

Sesso	F	M	F	M	F	M	F	M
Età	30 giorni	30 giorni	60 giorni	60 giorni	90 giorni	90 giorni	14 anni	Max
Limite Inferiore (nmol/L)	7,26	0,45	4,84	10,89	0,45	5,14	0,45	1,52
Limite Superiore (nmol/L)	50,84	24,21	29,35	41,46	9,38	12,1	5,14	6,36

1.3.1. Iperplasia Surrenalica Congenita (CAH)

L'iperplasia surrenalica congenita comprende un gruppo di disordini ereditari della biosintesi del cortisolo caratteristica delle prime settimane di vita; comporta l'incapacità delle ghiandole surrenali di produrre una quantità sufficiente di cortisolo e può aumentare la produzione degli androgeni.

La condizione può anche svilupparsi più tardi nella vita in modi meno evidenti. Alcuni sintomi comuni includono un tono muscolare ben definito, un aumento dei peli sul corpo e una voce più profonda. Nei neonati, la CAH può talvolta causare disidratazione o shock, entrambe condizioni molto gravi. Di conseguenza, la determinazione del 17-OHP dovrebbe far parte dello screening neonatale [5].

La forma più comune è dovuta a un deficit di 21-idrossilasi associato alle mutazioni nel gene CYP21A2, localizzato sul cromosoma 6p21. La diminuzione dell'attività enzimatica della 21-idrossilasi compromette la biosintesi del cortisolo, con conseguente aumento delle concentrazioni di 17-idrossiprogesterone e progesterone [3].

Clinicamente si distinguono in: forma classica (CAH) con deficit totale dell'enzima (attività residua 0-3%) e livelli molto elevati di 17-OHP e forma non classica (NC-CAH), con deficit enzimatico parziale (attività residua 30-50%) e livelli mediamente elevati di 17-OHP [6].

La NC-CAH può essere asintomatica o associata solo a pochi segni di iperandrogenismo e solitamente si manifesta più tardivamente nella fase finale dell'infanzia come pubertà precoce o in età giovane-adulta con quadri variabili di acne, irsutismo, irregolarità mestruali, anovularietà cronica, che configurano la cosiddetta forma late-onset che entra in diagnosi differenziale con la PCOS [7].

Nei soggetti nei quali la determinazione basale di 17-OHP [6]:

- risultati inferiore a 6 nmol/L, probabilmente si tratta di un individuo sano o con una forma di NC-CAH late onset;
- risultati compresa fra 6-30 nmol/L, è consigliato un test da stimolo con ACTH per migliorare l'accuratezza diagnostica;
- risultati superiore a 30 nmol/L, probabilmente si tratta di un soggetto affetto da CAH e non vi è indicazione al test dinamico.

1.3.2. Sindrome dell'ovaio policistico (PCOS)

La sindrome dell'ovaio policistico è un complesso di sintomi derivante da uno squilibrio ormonale nelle donne in età riproduttiva. La PCOS colpisce statisticamente il 5-20% della popolazione femminile in età fertile. Benché le cause della PCOS non siano ancora state completamente accertate, si pensa che siano correlabili a una disregolazione dell'attività del citocromo P450c17 che colpisce la 17 α -idrossilasi con aumento della produzione di androgeni sia a livello ovarico che surrenalico [8].

L'analisi del 17-OHP sierico (basale ed eventualmente dinamico) entra nella valutazione degli iperandrogenismi, in quanto permette di differenziare una PCOS da una forma non classica late-onset, che a livello fenotipico possono essere indistinguibili [9].

1.4. Determinazione del 17-OHP: metodi analitici

Il 17-OHP sierico può essere determinato con metodi immunometrici o con metodi in spettrometria di massa.

1.4.1. Metodi immunometrici

I metodi immunometrici rappresentano le tecniche analitiche tradizionali e attualmente impiegate in routine per le analisi quantitative degli ormoni steroidei, compreso il 17-OHP [10].

Le tecniche immunometriche sfruttano una reazione immunologica antigene anticorpo (policonale o monoclonale) con formazione di un immunocomplesso antigene-anticorpo la cui presenza è segnalata da un rivelatore.

In un tipico sistema immunoenzimatico sono sempre presenti i seguenti componenti: il ligando, che è la molecola da cercare; il coniugato, che è l'anticorpo legato all'enzima rivelatore; il substrato cromogeno, una molecola incolore che viene attaccata all'enzima.

Le tecniche immunometriche sono classificate sulla base dei seguenti parametri [11]:

- meccanismo di formazione dell'immunocomplesso: competitivi e non competitivi;
- modalità di separazione dell'immunocomplesso: omogenei ed eterogenei;
- tecniche di rilevazione: **radioisotopica** (RIA-IRMA), **assorbanza** (EIA-ELISA), **chemiluminescenza** (CLIA), **fluorescenza** (FIA), **elettrochemiluminescenza** (ECLIA);
- presenza di un passaggio di purificazione del campione: diretti ed estrattivi.

In passato il dosaggio del 17-OHP era affidato ai RIA: l'uso di traccianti radioattivi rendeva questa tecnica estremamente sensibile, ma gli elevati costi, il rischio chimico, lo smaltimento dei rifiuti e la necessità di personale dedicato, hanno indotto i laboratori clinici ad abbandonare queste tecniche [12].

I metodi manuali in micropiastra (ELISA o EIA) hanno quindi sostituito i metodi RIA e recentemente in commercio si è reso disponibile un metodo completamente automatizzato con rilevazione in chemiluminescenza.

Se da una parte i metodi immunometrici automatizzati hanno il vantaggio di avere un'elevata produttività (high throughput), anche grazie alla modalità di lavoro random-access, un'elevata facilità di utilizzo e consentono rapidi tempi analitici, dall'altra parte mantengono gli svantaggi dei tradizionali metodi immunometrici per gli ormoni steroidei: scarsa specificità degli anticorpi con conseguenti interferenze significative; inoltre spesso hanno un intervallo di linearità ristretto e la sensibilità analitica può non essere soddisfacente.

Infatti, è ben noto che la misurazione degli steroidi mediante tecniche immunometriche soffre di numerose cross-reattività e falsi positivi, ma può portare anche a falsi-negativi. La mancanza di selettività si riflette sull'accuratezza della quantificazione, causando quindi un bias analitico.

1.4.2. Metodi in spettrometria di massa

I metodi in cromatografia liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) rappresentano i metodi di riferimento per l'analisi degli ormoni steroidei nei fluidi corporei. La modalità di monitoraggio a reazione multipla (MRM) della spettrometria di massa (MS) tandem, combinata con la separazione cromatografica in HPLC, migliora significativamente la specificità e la selettività analitiche necessarie per la differenziazione degli steroidi [13].

In generale, possiamo suddividere il metodo analitico della LC-MS/MS in tre fasi: a) la preparazione del campione, b) la separazione cromatografica e c) la rivelazione in spettrometria di massa.

a) Nella **preparazione del campione** l'analita viene estratto dalla matrice e preconcentrato prima dell'analisi. Tra i metodi di preparazione del campione, i più frequentemente utilizzati in LC-MS/MS sono: Precipitazione Proteica (PP), Estrazione in fase solida (SPE), Liquid-Liquid Extraction (LLE).

La *precipitazione proteica* è un metodo utilizzato per eliminare le proteine dalla matrice, e quindi permette di purificare il campione da eventuali contaminanti contenuti nel siero.

Il meccanismo alla base della precipitazione è l'attrazione tra le parti caricate negativamente e positivamente delle molecole e l'avvicinamento reciproco delle parti idrofobiche che permettono alle proteine in soluzione di aggregarsi e precipitare [14].

Gli agenti precipitanti comunemente utilizzati includono reagenti organici come acetonitrile, metanolo, isopropanolo e reagenti salini come $ZnSO_4$.

La *SPE* è una tecnica cromatografica "grezza" che permette di purificare il campione prima di procedere con l'analisi cromatografica, spesso semplificando e migliorando l'analisi finale qualitativa e quantitativa. Inoltre, può permettere di concentrare gli analiti, aumentando la sensibilità del metodo, rimuovere le interferenze che possono causare un rumore di fondo troppo alto e proteggere la colonna analitica da contaminanti.

Nella *SPE*, l'analita contenuto in un campione liquido viene isolato mediante estrazione, partizione e/o adsorbimento su una fase solida stazionaria. I principali adsorbenti utilizzati in *SPE* sono le resine polimeriche, il gel di silice, adsorbenti naturali, carbone grafitato nero (GCB) e polimeri a stampo molecolare (MIPs). In particolare, il sorbente polimerico a fase inversa viene utilizzato come componente delle *SPE* in piastra o resina delle cartucce per l'estrazione di un'ampia gamma di composti da varie matrici [15].

La *LLE* viene utilizzata per separare le sostanze in base alla loro solubilità, utilizzando due diversi liquidi immiscibili. Dopo aver agitato energicamente la miscela e aver lasciato sedimentare i liquidi, si ottiene un sistema bifasico. La fase inferiore o quella superiore contengono la sostanza estratta. Analogamente ad altre manipolazioni del campione, l'implementazione manuale di questa operazione in LC-MS/MS è solitamente laboriosa e richiede molto tempo, richiedendo il più delle volte grandi quantità di sostanze chimiche che potrebbero essere dannose per l'operatore, costose e pericolose per l'ambiente [16].

b) Le **tecniche di cromatografia liquida** permettono la separazione dei componenti di matrici complesse.

Nel campo clinico diagnostico vengono utilizzate maggiormente la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e la Ultra (High) Performance Liquid Chromatography U(H)PLC dove le pressioni di esercizio raggiungono livelli più alti rispetto alla HPLC classica.

Questa tecnica presenta svariati vantaggi, tra cui:

- una dimensione ridotta della colonna che evita movimenti longitudinali della fase mobile;
- contropressioni maggiori, vengono raggiunti anche i 1000 bar;
- tempi d'analisi contenuti;
- alta sensibilità e risoluzione, per la separazione di molecole simili tra loro

Le molecole con proprietà diverse (volatilità, polarità, dimensione molecolare, carica) si distribuiscono in modo diverso tra due fasi: fase stazionaria, composta da un tubo lungo e sottile (colonna) con all'interno particelle solide porose e fase mobile liquida che fluisce in modo continuo su quella stazionaria. Nel passaggio attraverso la colonna ogni componente A si distribuisce in base al potenziale chimico della fase stazionaria (s) e la mobile (m): $A_m \rightleftharpoons A_s$

I componenti essenziali dei sistemi HPLC utilizzati per i metodi clinici LC-MS comprendono le fasi mobili, degassatori di fase mobile, un sistema di pompaggio delle fasi mobili, miscelatori, un sistema di iniezione, un forno per colonne a temperatura controllata e un sistema di controllo del flusso.

L'aggiunta di una valvola di commutazione dopo la colonna consente di deviare una porzione selezionata dell'eluato allo spettrometro di massa, favorendo la rivelazione nel tempo di ritenzione dell'analita.

c) La **spettrometria di massa** è un metodo d'analisi che permette di studiare la composizione chimica di una sostanza, conosciuta o sconosciuta, in base al suo profilo di frammentazione caratteristico. Lo spettrometro di massa è uno strumento che produce ioni e li separa in fase gassosa in base al loro rapporto massa/carica (m/z).

Lo spettrometro di massa si compone essenzialmente di quattro parti, che il campione attraversa in sequenza: il sistema di introduzione del campione, la sorgente ionica, l'analizzatore e il rivelatore.

Il campione uscente dal sistema HPLC viene iniettato nella sorgente di ionizzazione. Esistono varie sorgenti ioniche per gli spettrometri di massa, tra le tecniche più utilizzate nella LC-MS clinica ci sono la ionizzazione Electrospray (ESI), la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI) e la fotoionizzazione a pressione atmosferica (APPI).

La ionizzazione Electrospray (ESI) è una tecnica di ionizzazione molto sensibile. Uno spray di solvente si forma mediante l'applicazione di un potenziale ad alta tensione tra un capillare di acciaio inossidabile e l'orifizio dello strumento e il flusso di un gas di nebulizzazione (tipicamente azoto). Il campione è nebulizzato e ionizzato: si forma un cono di Taylor e gocce che contengono ioni con cariche positive e negative che si staccano dal capillare. Il solvente evaporando aumenta la densità delle gocce di carica fino ad arrivare a un livello critico, che permette agli ioni di venire espulsi dalla goccia (esplosione coulombiana). Perché la tecnica funzioni devono già essere presenti in soluzione gli ioni.

La APCI sfrutta i vapori di solvente che accompagnano l'analita durante l'eluizione cromatografica dopo un riscaldamento, per produrre su di essi la prima ionizzazione mediante un elettrodo a corona.

A differenza dell'ESI, per ionizzare l'analita di interesse non viene utilizzato un forte potenziale di tensione tra l'ago del capillare e l'orifizio dello strumento, al contrario, per ionizzare le molecole di solvente e gli analiti nell'aerosol viene utilizzata una scarica a corona (corona discharge) che applica un alto voltaggio su l'ago. Gli ioni rilasciati nella fase gassosa vengono poi analizzati dallo spettrometro di massa. Durante la ionizzazione nella sorgente APCI, può verificarsi una certa degradazione termica, che comporta un maggior grado di frammentazione nella ionizzazione electrospray. Per ottenere le migliori prestazioni analitiche con l'APCI, gli ioni della sorgente devono essere stabili al calore e volatili. L'APCI può essere meno suscettibile agli effetti della matrice (compresa la soppressione ionica) rispetto all'ESI e può essere preso in considerazione per molte applicazioni, compresa la misurazione di analiti non polari.

L'analizzatore è quella componente dello spettrometro di massa che consente di separare gli ioni generati nella camera di ionizzazione in base al loro rapporto massa/carica (m/z).

L'analizzatore a quadrupolo consiste in un tubo rettilineo con il vuoto e in cui sono presenti quattro barre parallele, disposte simmetricamente intorno all'asse del tubo, di sezione circolare oppure iperbolica. Le barre diametralmente opposte sono in contatto elettrico tra di loro, mentre tra barre adiacenti è applicato un voltaggio formato da due componenti: una differenza di potenziale continua e una oscillante ad alta frequenza. Lo ione entra nell'analizzatore, parallelamente all'asse z , ed è spinto dai campi elettrici, continuo ed oscillante, a seguire una traiettoria a spirale. Solo gli ioni di una certa m/z avranno un percorso di volo stabile attraverso il quadrupolo, mentre gli altri ioni avranno traiettorie instabili e non raggiungeranno il rivelatore.

Uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo contiene due analizzatori di massa a quadrupolo separati da una cella di collisione (vedi Figura 2.). Gli ioni precursori vengono selezionati dal primo analizzatore di massa a quadrupolo. Gli ioni selezionati vengono poi frammentati nella cella di collisione mediante un processo noto come dissociazione indotta da collisione (CID). La CID deriva dalla collisione dell'analita di interesse con un gas inerte, come azoto o argon.

I pattern degli ioni prodotti e l'abbondanza relativa degli ioni possono essere altamente riproducibili se le condizioni CID sono mantenute in modo coerente. Gli ioni prodotti vengono selezionati dall'analizzatore di massa a quadrupolo finale e passati al rivelatore. In questo modo, solo gli ioni dell'analita che hanno una specifica transizione di massa (coppia di ioni precursore/prodotto) sono in grado di raggiungere il rivelatore, determinando l'elevata specificità dei metodi di spettrometria di massa a quadrupolo tandem. Questa modalità di acquisizione dei dati viene definita monitoraggio della reazione selezionata (SRM). Quando vengono monitorate più transizioni, l'approccio può essere chiamato anche monitoraggio di reazioni multiple (MRM) [17].

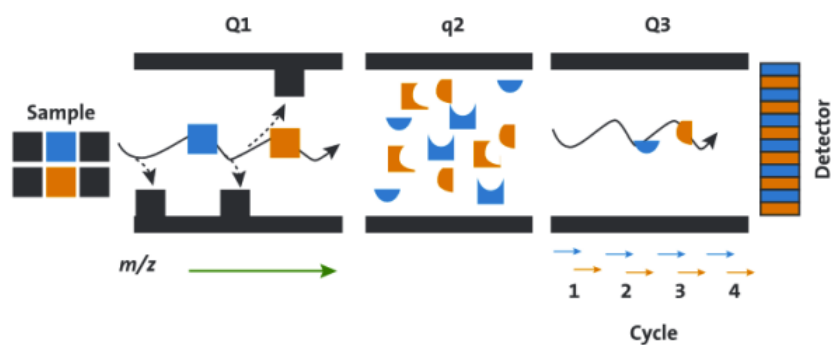


Figura 2. Schema di uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo, tratta da Strathmann e Hoofnagle [18].

L'analisi quantitativa sfrutta la misurazione dell'area dei picchi. L'area di ciascun picco è la rappresentazione della risposta per quella specifica transizione di massa rilevata dallo spettrometro di massa. L'area del picco dell'analita è in relazione diretta alla concentrazione di analita nel campione.

Quando vengono identificati due transizioni di massa è possibile utilizzarne una come ione quantificatore (solitamente il frammento più abbondante), e l'altra come ione qualificatore, usato proprio per confermare che gli ioni derivano dallo sterioide target piuttosto che da un interferente. Specialmente per le molecole endogene vengono utilizzati ioni qualificatori in modo da garantire la specificità dell'analisi. Inoltre, la valutazione degli ion ratio (rapporti tra lo ione quantificatore e qualificatore) consente di monitorare eventuali interferenze [19].

I metodi di analisi sono tutti indiretti. Si costruisce prima una curva di calibrazione con soluzioni standard (soluzioni a concentrazione nota dell'analita, materiale di riferimento -CRM) e si ricava la concentrazione dell'analita nella miscela in esame mediante interpolazione.

Se però nella miscela che arriva alla sorgente sono presenti contaminanti, la sostanza chimica di interesse viene comunque ionizzata, ma una parte della carica viene deviata verso questi contaminanti indesiderati, riducendo la frazione dell'analita target che viene ionizzata con successo e introdotta nella MS. Questa ionizzazione compromessa dell'analita da parte dei contaminanti co-eluiti è chiamata "soppressione ionica". Si utilizzano, perciò, gli standard interni (IS) per correggere la soppressione degli ioni. Si tratta di preparazioni marcate isotopicamente di ciascun analita steroideo target. Questi composti sono facilmente distinguibili dal LC-MS/MS, che seleziona, ordina e misura simultaneamente le coppie di molecole. Lo IS, aggiunto in concentrazione nota in tutti i campioni (calibratori, controlli campioni dei pazienti), permette di valutare le perdite degli analiti durante il trattamento del campione e l'effetto matrice, di conseguenza i rapporti di segnale tra gli analiti e gli IS consentono di costruire una retta di calibrazione migliore [19].

1.6. Validazione di metodo home made LC-MS/MS

L'attività di un laboratorio comporta una serie di eventi importanti per permettere l'esecuzione routinaria dei test analitici. Una delle attività principali è la selezione e validazione di un test da introdurre in routine. Il laboratorio deve operare una scelta delle caratteristiche dei metodi, selezionando le più attendibili, in base alle sue proprietà strumentali e di produzione.

1.6.1. ISO 15189 e linee guida internazionali

L'UOC Medicina di Laboratorio di Padova è accreditato da ACCREDIA in conformità alla norma ISO 15189 dal 2016.

L'accreditamento è uno strumento essenziale per accertare la qualità dei servizi erogati dai laboratori medici, in linea con gli obiettivi nazionali ed europei di tutela della salute pubblica e di garanzia di un'assistenza sanitaria sicura. L'accreditamento secondo la norma ISO 15189 prevede la verifica di tutti i processi coinvolti nella gestione e attuazione degli esami, valutando i requisiti gestionali, requisiti tecnici, lo scopo, il campo di applicazione e i riferimenti normativi.

L'accreditamento attesta la competenza tecnica del laboratorio relativamente al campo di accreditamento, costituito dagli esami per la cui esecuzione viene attestata la competenza tecnica del laboratorio che dettaglia materiale/matrici/prodotti di prova, grandezze da determinare e metodo/i di prova utilizzato/i.

I metodi analitici interni (non commerciali, non normati, sviluppati in laboratorio) devono essere sottoposti a validazione, con lo scopo di dimostrare che il metodo è adeguato in base allo scopo d'uso previsto e soddisfa i requisiti per cui è stato sviluppato. I metodi analitici commerciali CE-IVD, procedure pubblicate in riviste referenziate, metodi tratti da Norme internazionali o linee guida, sono sottoposti a verifica prima dell'inserimento nella routine, con lo scopo di dimostrare che le caratteristiche prestazionali così come riportate dagli sviluppatori siano confermate nella loro esecuzione nel Laboratorio.

Validare un metodo in LC-MS/MS significa dare dimostrazione che esso è adeguato allo scopo per il quale è applicato. Tutti i passaggi necessari per una completa validazione dei metodi bioanalitici devono fare riferimento alle attuali linee guida internazionali: European Medicines Agency (EMA) e Food and Drug Administration (FDA). Ogni metodo analitico, usato nella pratica clinica e basato sulla letteratura, deve essere validato completamente, per dimostrare l'affidabilità di un metodo nella determinazione della concentrazione di un analita in una matrice biologica specifica [20].

1.6.2. Parametri di prestazioni analitiche

1.6.2.1. Range di misura analitico e linearità

Per iniziare a validare un metodo bisogna avere prima di tutto familiarizzazione con le procedure operative, valutare l'intervallo di misura, la calibrazione e il limite di sensibilità.

L'intervallo di quantificazione del metodo e quindi le concentrazioni degli standard di calibrazione vengono scelte sulla base dell'intervallo di concentrazione dell'analita ricercato atteso nei campioni dei pazienti. Quando il metodo viene convalidato, la curva di calibrazione deve essere continua e riproducibile.

Ogni curva di calibrazione è caratterizzata dal limite inferiore di quantificazione (LLOQ) e dal limite superiore di quantificazione (ULOQ) [21]. Ogni seduta analitica in LC-MS/MS prevede che la curva di calibrazione deve dare un coefficiente di determinazione (r^2) almeno di 0.990.

1.6.2.2. Specificità analitica

La specificità analitica è la proprietà del metodo di misurare esclusivamente l'analita di interesse, senza interferenze da parte di altre sostanze presenti nel campione. La specificità di un metodo LC-MS/MS è garantita a livello del detector con la modalità MRM (multiple reaction monitoring) e a livello della cromatografia (riuscendo a separare i composti isobari) [21]. Nel caso specifico del 17-OHP, l'esistenza dell'isobaro 11-deossicorticoosterone (11-DOC) impone che nello sviluppo di un metodo analitico per la determinazione del 17-OHP preveda un gradiente studiato per permetterne la separazione cromatografica, poiché lo spettro di massa degli isobari è il medesimo e i frammenti seguiti in massa i medesimi.

1.6.2.3. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica è la capacità di distinguere piccole differenze nelle concentrazioni di analiti.

Il limite di rilevamento (LOD) è la concentrazione alla quale il rivelatore restituisce un segnale dell'analita almeno 5 volte superiore il segnale di base di un campione bianco [20].

Il limite di quantificazione (LOQ) è la concentrazione più bassa di un analita che può essere misurata con precisione. È la concentrazione minima refertabile e corrisponde all'LLOQ.

Il limite di quantificazione è il parametro utilizzato in LC-MS/MS per quantificare la sensibilità del metodo e per determinarlo si calcolano media, deviazione standard (DS) e coefficiente di variazione % (CV%) di 10 replicati intra-serie nell'intorno di un campione biologico a bassa concentrazione, spingendosi finché l'imprecisione all'LOQ non sia superiore al 20% [21].

1.6.2.4. Accuratezza, esattezza e stima dell'inesattezza

Nella validazione del metodo, il parametro di maggiore interesse è l'accuratezza, il grado di concordanza fra il risultato di una singola misurazione e il valore vero del misurando.

L'esattezza invece rappresenta il grado di concordanza tra il valore medio ottenuto a partire da diverse determinazioni dello stesso misurando e un valore di riferimento accettato. Viene espressa come bias che è lo scostamento sistematico rispetto al valore vero.

L'esattezza dipenderà da quanto accurata è la scelta dei materiali di calibrazione, la loro concentrazione e soprattutto dalla scelta della matrice che deve essere il più possibile commutabile con quella dei campioni reali. È preferibile utilizzare calibratori con un grado di incertezza definito, utilizzando un materiale di riferimento certificato (CRM) [17].

L'esattezza può essere valutata analizzando per almeno cinque misurazioni replicate in almeno tre differenti sedute analitiche per concentrazione, utilizzando almeno tre campioni a concentrazioni note (con sistema di misura di riferimento, materiali di riferimento certificati in matrice). L'esattezza viene valutata come bias percentuale con la seguente formula:

$$\text{Bias\%} = [(\text{valore medio delle misurazioni} - \text{valore target}) / \text{valore target}] * 100$$

Quando non si hanno a disposizione materiali a concentrazione nota, si può procedere alla stima dell'inesattezza attraverso prove di recupero e prove di diluizione [21].

Prove di recupero. Il recupero indica la quantità di analita determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità attesa; viene espresso come percentuale del rapporto tra la differenza delle concentrazioni misurate e della concentrazione endogena e la concentrazione aggiunta. La differenza tra il recupero ottimale (100%) e il valore ottenuto determina il valore di bias % che si può utilizzare per valutare l'esattezza del metodo.

$$\text{Recupero} = [(\text{concentrazione misurata} - \text{concentrazione endogena}) / \text{concentrazione aggiunta}] * 100$$

Il recupero deve rientrare tra il $100 \pm 15\%$ [21].

Prove di diluizione. Il rapporto tra le concentrazioni ottenute e le concentrazioni attese in base alle diluizioni ottenute su campioni diluiti in maniera scalare fino all'LLOQ. I campioni selezionati si possono arricchire con l'aggiunta di standard in modo da partire da campioni a concentrazioni molto elevate per poi diluirli in maniera scalare usando come diluente la matrice della curva di calibrazione. Il rapporto percentuale tra le concentrazioni ottenute e le concentrazioni attese dovrà rientrare nel $100 \pm 15\%$ [21].

1.6.2.5. Imprecisione

L'imprecisione di un metodo analitico è definita come il grado di concordanza fra misurazioni indipendenti di concentrazione di un analita e deve includere tutto il processo di analisi, dalla raccolta del campione e conservazione, alla preparazione fino all'analisi strumentale.

La precisione può essere valutata con almeno 10 misurazioni indipendenti per ogni livello di concentrazione e viene espressa come coefficiente di variazione percentuale (CV%), che si determina dal rapporto percentuale tra la deviazione standard e la media ottenute.

La precisione deve essere valutata sia nella stessa seduta analitica (precisione nella serie o ripetibilità) che tra sedute analitiche diverse (precisione tra le serie o precisione intermedia), per un minimo di tre livelli di concentrazione; il CV% non deve essere superiore al 15% [21].

1.6.2.6. Effetto matrice

L'effetto matrice (ME) è un'alterazione o un'interferenza diretta o indiretta nella risposta a causa della presenza di analiti non previsti (per l'analisi) o di altre sostanze interferenti nel campione [21].

L'ME è uno dei più importanti parametri da investigare durante lo sviluppo di un metodo in LC-MS/MS; tale effetto può dare origine a una soppressione o a un incremento del segnale.

I campioni utilizzati per lo studio del ME devono rispecchiare la tipologia di campioni per cui il metodo è stato sviluppato. La valutazione post-estrazione dell'effetto matrice è il metodo di eccellenza in quanto ne permette una misurazione diretta sia sugli analiti che sugli standard interni.

L'effetto matrice di un metodo dovrebbe essere entro $\pm 20\%$ [22].

1.6.2.7. Stabilità

Una volta preparati, i campioni potrebbero non essere analizzati immediatamente. Questo potrebbe essere dovuto al tempo di attesa nell'autocampionatore, o al verificarsi di un blocco strumentale. Potrebbe anche essere necessario rianalizzare gli stessi campioni il giorno successivo [21].

Lo studio della stabilità dei campioni processati viene solitamente condotto simulando le situazioni che possono avvenire nella routine. Si va a valutare la significatività nei valori ottenuti nelle iniezioni successive rispetto alla prima iniezione.

Il campione è considerato stabile alla specifica condizione in valutazione se la concentrazione media di ogni livello rientra nel $\pm 15\%$ della concentrazione determinata al tempo zero [21].

Lo studio della stabilità pre-analitica serve a valutare la conservazione del campione in condizioni di temperatura differenti, affinché la sua concentrazione non si discosti in modo significativo dal valore iniziale del prelievo. Lo studio della stabilità è una parte importante del metodo di validazione al fine di garantire una corretta gestione dei campioni biologici durante l'intero processo analitico. I parametri e le condizioni da valutare dovrebbero eccedere per coprire i normali tempi delle procedure di campionamento e analisi (come stimato dalla normale gestione del laboratorio).

1.6.2.8. Comparabilità tra due metodi

Spesso quando si implementa un metodo LC-MS/MS si parte da un altro metodo già utilizzato in routine. Un requisito della ISO15189 è di valutare la comparabilità tra il metodo in uso e il nuovo metodo. Si va a valutare se il nuovo metodo può eventualmente sostituire il metodo attualmente in uso, senza comprometterne l'outcome clinico e se i valori di riferimento utilizzati possono essere mantenuti o variati. Viene stimata la differenza dei risultati in almeno 40 campioni di pazienti tra i due metodi, cercando di andare a coprire l'intero intervallo di misura analitico.

I risultati possono venire elaborati utilizzando l'analisi di Passing Bablok [23]. I dati ottenuti con il metodo in uso sono riportati in un grafico sull'asse delle x, mentre sull'asse delle y vengono riportati i dati ottenuti con il metodo in prova. Con questo tipo di regressione, si ipotizza che entrambi i metodi siano soggetti a errore. Vengono valutati il valore della pendenza e il valore dell'intercetta, assieme ai corrispettivi intervalli di confidenza al 95%. Se gli intervalli di confidenza dell'intercetta passano per lo 0, non si avrà bias costante significativo; se gli intervalli di confidenza della pendenza passano per l'1, non si avrà bias sistematico.

2. SCOPO

Lo scopo di questa tesi è di ottimizzare la procedura di preparazione del campione di un metodo “home-made” basato sulla cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa, con sorgente elettrospray per la determinazione del 17-OHP sierico al fine di implementarlo nella routine del laboratorio.

Partendo da una procedura validata che prevede una preparazione del campione manuale su colonnina preceduta da una precipitazione proteica in vial, il lavoro di tesi ha previsto una serie di modifiche che permettessero tutta la preparazione del campione su micropiastra a 96 pozzetti. Questi cambiamenti sono necessari per l’automazione del metodo sfruttando il preparatore automatico di pipettaggio dei liquidi per poter garantire minori possibilità di errori, una maggiore riproducibilità della fase di pre-trattamento e una diminuzione nell’impiego delle risorse umane.

Questo metodo poi deve essere validato secondo le linee-guida internazionali, rendendolo conforme allo Standard Internazionale di accreditamento per i laboratori medici ISO 15189:2012.

Infine, si vuole arrivare ad attivare il metodo nella routine di laboratorio per permettere una diagnosi accurata grazie alla refertazione dei livelli di 17-OHP ottenuti con una strumentazione analitica più sensibile e specifica rispetto alla tecnica immunochemiluminescente attualmente utilizzata.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Campioni biologici

Per le prove di validazione i campioni utilizzati sono campioni di siero di pazienti rimanenti dalla routine afferenti all'Ospedale-Università di Padova.

Per lo studio di stabilità pre-analitica e la differenza fra matrici sono stati reclutati 5 soggetti volontari fra il personale di laboratorio a cui sono state prelevate 2 provette ocra da siero con attivatore della coagulazione e gel separatore, una provetta rossa da siero con attivatore della coagulazione senza gel separatore e una provetta lilla con anticoagulante EDTA-K3. I campioni opportunamente centrifugati, sono stati aliquotati e conservati a -80°C fino al momento delle determinazioni.

Per la comparabilità dei metodi sono stati selezionati 40 campioni di pazienti richiedenti la determinazione del 17-OHP (39 pazienti totali di cui 35 femmine e 5 maschi), analizzato della metodica immunometrica (metodo immunometrico competitivo in chemiluminescenza (CLIA) MAGLUMI® 2000 plus platform (Snibe, China)).

3.2. Standard, Standard Interno e 11 deossicorticoosterone

Standard certificato 1 mg/mL di 17-OHP in metanolo (Cerilliant Sigma Aldrich, USA) in soluzioni madri e di lavoro in metanolo a opportune concentrazioni per ottenere, mediante diluizioni seriali in acqua fisiologica, i calibratori nel range di concentrazioni 0,5-100 nmol/L.

Standard interno (IS) ¹³C₃-17-OHP, isotopo stabile del 17-OHP marcato con carbonio 13 (Cambridge Isotope Laboratories, UK), ottenuto dalla ricostituzione di 1 mg di polvere con 1 mL di metanolo, da cui si sono ricavate soluzioni madri a 10 mg/L e di lavoro a 50 µg/L in metanolo.

11-deossicorticoosterone (11-DOC): 100 µg/mL in metanolo (Cerilliant Sigma Aldrich, USA)

3.3. Controlli di qualità

Controlli di qualità interni (CQI): Lyphocheck Immunoassay Plus Control, livelli 1, 2, 3 (BIORAD, USA).

Controlli di qualità esterno (VEQ): tre campioni del programma di Valutazione Esterna di Qualità (Ente QUALIMEDLAB, programma Ormoni 2).

3.4. Reagenti

Acetonitrile (CH₃CN) Hypergrade for LC-MS (Sigma Aldrich, Germany)

Metanolo (CH₃OH) for UHPLC-MS (Carlo Erba, Milano)

Acido formico 99% purezza (HCOOH) (Carlo Erba, Milano);

Acqua distillata ultrapura (sistema di purificazione Millipore dell' AoP)

Soluzione fisiologica 0,9% (Monico Spa, Venezia Mestre)

Solfato di Zinco eptaidrato (ZnSO₄) (Carlo Erba, Milano)

Soluzione precipitante (PP) = 4:1 CH₃OH:ZnSO₄ 0,3M

3.5. Strumentazione

Sonicatore VEVOR[®] Digital Ultrasonic Cleaner (Sanven Corporation Ltd, USA)

Centrifuga eppendorf Pico[™] 17 Microcentrifuge (Thermo Fisher Scientific[™] Inc, USA)

Centrifuga Megafuge 1.0 Heraeus (Thermo Fisher Scientific[™] Inc, USA)

Vortex ZX3 (VELP Scientifica S.r.l., Italy)

Centrifuga per piastre UNIVERSAL 320 (Hettich, Germany)

Miscelatore orbitale Te-Shake integrato nella workstation Freedom EVO[®] (TECAN, Switzerland)

Sistema LCMSMS: LCMS 8060 (Shimadzu, Japan).

3.6. Altri materiali

Cartucce (colonnine) SPE (Oasis HLB 1 mL (30mg) cartridges, Waters, USA)

UPLC 700 µL Round 96 Well Sample Plate (Waters, USA)

SPE Oasis HLB 96-well µElution Plate (Waters, USA)

Cap-mat 96-well 7 mm Round Plug Pre-slit Silicone/PTFE, 5/pk (Waters, USA)

Provette di vetro 12x75

VialsChromacol 2-SVST-CP 2 mL (Thermo Fisher Scientific[™] Inc, USA)

Conetti di polipropilene (Eppendorf, Germany)

Pipette da 100, 200, 1000 e 5000 uL (Eppendorf, Germany) con puntali idonei

Pipetta ripetitiva (Eppendorf, Germany) con puntali idonei

3.7. Metodo LC-MS/MS: condizioni strumentali

3.7.1. Condizioni cromatografiche

La strumentazione HPLC utilizzata è un sistema Nexera X2 (Shimadzu, Japan).

È composto da moduli interconnessi:

- Linee A e B fasi mobili;
- Sistema di pompaggio 3 moduli LC-30AD Pump, utilizzati moduli A e B;
- Autosampler SIL-30AC;
- Compartimento colonne termostato CTO-20AC;
- Modulo di gestione del sistema CBM-20.

La colonna cromatografica utilizzata è ACQUITY UPLC HSST3 100Å, 1,8 µm, 2,1 x 100 mm (Waters, USA).

Le condizioni iniziali cromatografiche sono state ottenute prendendo spunto dall'Application Notes di Waters [24], e sono riportate nella tabella II.:

Tabella II. Condizioni del metodo cromatografico.

Fase mobile A (acquosa)	Acqua distillata ultrapura + 0,1% Acido formico
Fase mobile B (organica)	Acetonitrile + 0,1% Acido formico
Soluzione di lavaggio ago	50:25:25 Acqua distillata ultrapura: Metanolo: Acetonitrile
Temperatura compartimento colonne termostato	40° C
Flusso	0,6 mL/min
Pressione iniziale	≈ 680 bar
Tempo di una corsa	9 minuti
Volume di iniezione	15 µL

Prima di ogni iniezione di un campione, viene lavato l'ago internamente ed esternamente con la soluzione dedicata per ridurre il carryover.

Al termine di ogni seduta viene effettuato un lavaggio della colonna che prevede 15 min di Acqua distillata ultrapura e 15 min di Acetonitrile.

Il gradiente cromatografico è riportato nella Tabella III.

Tabella III. Gradiente cromatografico.

Time (min)	Fase mobile A	Fase mobile B
0	0,7	0,3
2	0,5	0,5
4	0,45	0,55
5	0,05	0,95
7	0,05	0,95
7,1	0,7	0,3
9	0,7	0,3

Il tempo di acquisizione della massa è stato impostato tra 2 min e 4 min, in modo da ridurre la quantità di campione che arriva allo spettrometro di massa così da garantirne una migliore pulizia. Il tempo di ritenzione del 17-OHP, con queste condizioni, è 3,20 min.

3.7.2. Condizioni dello spettrometro di massa

La spettrometria di massa abbinata al sistema HPLC è un sistema triplo quadrupolo LCMS8060 (Shimadzu, Japan) (Figura 3).



Figura 3. Sistema LCMS-8060 (Shimadzu, Japan), adattata da Shimadzu [25].

Il sistema è composto da:

- Sorgente ionica: IonFocus™ (ESI);
- Sistema ottico: Q-array;
- Analizzatore di massa: Q1 e Q3;

- Cellula di collisione: Q2;
- Rivelatore;
- Pompa rotativa: AC 200–240 V, permette allo strumento di lavorare in sottovuoto.

La rivelazione viene eseguita mediante spettrometria di massa con monitoraggio a reazione multipla (MRM).

L'ottimizzazione dei parametri viene eseguita dallo strumento in automatico, selezionando successivamente i risultati che portano a una sensibilità maggiore (vedi Tabella IV.).

Tabella IV. Parametri MRM per il 17-OHP e il suo isotopo stabile marcato come standard interno.

Analita	Ione precursore (m/z)	Ione prodotto (m/z)	Potenziale in entrata (eV)	Potenziale di collisione (eV)	Potenziale in uscita (eV)
17-OHP- ione quantificatore	331,05	109,05	-16	-28	-20
17-OHP- ione qualificatore	331,05	97,05	-16	-25	-17
¹³ C ₃ -17-OHP- standard interno	334,4	112,2	-16	-28	-20

Parametri della sorgente ESI (vedi Tabella V.):

Tabella V. Condizioni spettrometro di massa.

Temperatura dell'interfaccia	400° C
Temperatura DL	250° C
Flusso gas riscaldamento	13 L/min
Temperatura Blocco termico	300° C
Flusso gas essiccazione	7 L/min
Flusso gas nebulizzante	3 L/min

Il software di gestione e analisi è LabSolution™ LCMS (Shimadzu, Japan).

3.8. Procedura di preparazione del campione

La procedura di preparazione del campione di partenza prevede una fase iniziale di precipitazione proteica (PP) in vial e una seconda fase di estrazione in fase solida (SPE). Questa seconda procedura è stata condotta con colonnine SPE Oasis HLB 1 mL (Waters, USA) (vedi Tabella VI.).

Tabella VI. Preparativa del campione in vial e colonnine.

N	Passaggi	Volume (µL)	Centrifugazione	
			velocità (RPM)	tempo (min)
PRECIPITAZIONE PROTEICA				
1	Dispensare calibratori/controlli/campioni nei conetti	150	-	-
2	Aggiungere lo SI 50 µg/L in metanolo	50	-	-
3	Aggiungere la soluzione precipitante	300	-	-
4	Vortex per qualche secondo	-	-	-
5	Centrifugare	-	15000	5
SPE				
6	Caricamento del surnatante	350	-	-
7	Centrifugare	-	700	3
8	Lavaggio con acqua distillata ultrapura	300	-	-
9	Centrifugare	-	1500	2
10	Lavaggio con una soluzione 30:70 metanolo: acqua	300	-	-
11	Centrifugare	-	1500	2
12	Centrifugare	-	2000	2
13	Eluizione con una soluzione 90:10 acetonitrile: metanolo	200	-	-
14	Centrifugare	-	700	2
15	Centrifugare	-	3500	2
16	Trasferire l'eluato nelle vial da massa e posizzionarle nell'autocampionatore del sistema LC-MS/MS			

La preparativa del campione è stata modificata per sostituire le vial utilizzate nella PP e le colonnine usate per la SPE con le micropiastre. Sono stati poi semplificati i passaggi dell'SPE per consentire un'automazione più semplice ed è stata migliorata la sensibilità diminuendo il rumore di fondo dai cromatogrammi.

Le principali modifiche sulla preparativa dei campioni sono:

- La diminuzione del volume del caricamento del surnatante da 350 µL a 150 µL (vedi Tabella VII. punto 6);
- 3 lavaggi SPE con un'unica soluzione (25% metanolo), anziché 2 lavaggi con acqua distillata ultrapura e soluzione 30:70 metanolo: acqua;
- La diminuzione del volume di eluizione, soluzione 90:10 acetonitrile: metanolo, da 200 µL a 150 µL (vedi Tabella VII, punto 15);

- Diluizione 1:2 dei campioni nell'eluizione finale (100% di fase organica) con acqua distillata ultrapura, per ottenere picchi cromatografici con un'alta risoluzione, migliorando inoltre la stabilità del campione all'interno dell'autosampler (vedi Tabella VII, punto 18);
- Il passaggio alla preparativa in micropiastra ha vincolato un cambio di centrifuga, modificando la velocità e il tempo della centrifugazione finale della PP e dei passaggi di lavaggio e di eluizione dell'SPE.

Tabella VII. Preparativa del campione in micropiastra.

N	Passaggi	Volume (µL)	Centrifugazione	
			velocità (RPM)	tempo (min)
PRECIPITAZIONE PROTEICA				
1	Dispensare calibratori/controlli/campioni nella piastra	150	-	-
2	Aggiungere lo SI 50 µg/L in metanolo	50	-	-
3	Aggiungere la soluzione precipitante	300	-	-
4	Vortex Te-shake	-	-	2
5	Centrifugare	-	3800	3
SPE				
6	Caricamento del surnatante	150	-	-
7	Centrifugare	-	1200	3
8	Lavaggio con metanolo 25%	200	-	-
9	Centrifugare	-	1700	1
10	Lavaggio con metanolo 25%	200	-	-
11	Centrifugare	-	1700	1
12	Lavaggio con metanolo 25%	200	-	-
13	Centrifugare	-	1700	1
14	Centrifugare	-	3800	2
15	Eluizione con una soluzione 90:10 acetonitrile: metanolo	150	-	-
16	Centrifugare	-	880	1
17	Centrifugare	-	3800	2
18	Aggiungere acqua distillata nella piastra di eluizione	150	-	-
19	Trasferire le piastre protette dal cap-mat 96-well nel sistema LC-MS/MS			

3.9. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata fatta utilizzando il software Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA); per la regressione di Passing-Bablok è stato utilizzato il programma di analisi statistica Analyse-it[®] Software (Ltd, UK).

3.10. Procedura di validazione del metodo

Sono state valutate le principali caratteristiche di prestazione analitiche per la validazione di un metodo quantitativo LC-MS/MS home-made: range di misura analitico, limite di quantificazione, inesattezza e stima dell'inesattezza, imprecisione, effetto matrice, stabilità pre-analitica e valutata la comparabilità tra i metodi.

3.10.1. Range di misura analitico

Si è costruita una curva di calibrazione a 7 punti a partire da 0,5 nmol/L fino a 100 nmol/L, in modo da comprendere i valori attesi nei campioni dei pazienti.

L'accettabilità della curva prevede un $r^2 > 0,990$.

3.10.2. Specificità: separazione dell'11-DOC

La specificità è stata valutata analizzando campioni bianchi e verificando l'assenza di specifiche interferenze al tempo di ritenzione del 17-OHP e del relativo SI. Per verificare la separazione cromatografica dell'isobaro 11-DOC dal 17-OHP sono state iniettate separatamente le soluzioni di standard 17-OHP e 11-DOC e poi è stato iniettato un mix delle due soluzioni 17-OHP + 11-DOC verificandone l'effettiva separazione.

3.10.3. Limite di quantificazione

Per la valutazione dell'LLOQ si è determinata l'imprecisione nella serie di un CQI diluito 1:4 con una bassa concentrazione che è stato ripetuto 10 volte nella stessa seduta analitica.

Come da linee guida, il CV% deve essere inferiore o uguale al 20%.

3.10.4. Inesattezza

Sono stati analizzati due campioni VEQ con un valore target prodotto dalla media di 30 laboratori che utilizzano un metodo LC-MS/MS. Viene calcolato il bias e valutata l'accettabilità in base al criterio dell'ente di VEQ.

3.10.5. Stima dell'inesattezza.

Prove di recupero: 4 campioni di pazienti sono stati arricchiti con 3 concentrazioni note di 17-OHP. Il volume deve essere minimo per evitare effetti di diluizione, per cui si sono utilizzati 3 standard ad alta concentrazione, rispettivamente di 10 nmol/L, 50 nmol/L e 100 nmol/L, per diluirli 1:10 nei 4 campioni con una concentrazione basale di 17-OHP di 0,63 nmol/L, 0,85 nmol/L, 1,00 nmol/L e 3,65 nmol/L.

È stato calcolato il recupero come: $[(\text{concentrazione misurata} - \text{concentrazione endogena}) / \text{concentrazione aggiunta}] * 100$.

Il recupero deve rientrare nel $100 \pm 15\%$.

Prove di diluizione: sono stati selezionati 3 campioni di pazienti arricchiti con un CRM di 17-OHP con concentrazione di 400,25 nmol/L diluito 1:10 e successivamente diluiti 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 in soluzione fisiologica. I livelli iniziali di 17-OHP sono risultati quindi 45,48 nmol/L, 43,24 nmol/L e 46,06 nmol/L per i 3 campioni. È stato poi calcolato il recupero % calcolato come rapporto percentuale tra valore ottenuto e valore atteso in base alla diluizione.

Il recupero deve rientrare nel $100 \pm 15\%$.

3.10.6. Imprecisione

Ripetibilità (imprecisione intra-serie): sono stati ripetuti 10 volte, nella stessa seduta analitica, 4 campioni di siero di cui CQI livello I, II e III e un campione di un paziente. Sono stati poi calcolati media, DS e CV%.

Riproducibilità (imprecisione inter-serie): sono stati ripetuti i tre livelli di CQI in 16 diverse sedute analitiche nell'arco di tre mesi. Sono stati quindi calcolati media, DS e CV% per ogni campione.

3.10.7. Effetto matrice

Un bianco con IS e un campione A di un paziente con IS sono stati estratti secondo procedura. Nella stessa seduta sono stati preparati un secondo bianco e il campione A alla quale sono state aggiunte quantità note di IS dopo la loro estrazione secondo procedura.

L'effetto matrice (ME) è calcolato come segue:

$ME\%_{\text{BLK}} = \text{Area IS aggiunto su BLK post-estrazione} / \text{Area IS aggiunto su BLK pre-estrazione} * 100$

$ME\%_{\text{A}} = \text{Area IS aggiunto su A post-estrazione} / \text{Area IS aggiunto su A pre-estrazione} * 100$

La media ME% è utilizzata per la valutazione dell'effetto matrice, che deve essere inferiore al 20%.

3.10.8. Stabilità dei campioni processati

Per lo studio sulla stabilità dei campioni già processati, conservati nell'autosampler a +8°C e ri-iniettati, sono stati analizzati 12 campioni di pazienti. Questi campioni sono stati iniettati in una prima seduta, re-iniettati il giorno dopo e due giorni dopo, tenendoli conservati nell'autocampionatore a +8°C.

Sono stati calcolati i valori di bias %, che devono risultare inferiori al 15%.

3.10.9. Stabilità pre-analitica

La stabilità del campione dopo centrifugazione e separazione del siero è stata valutata su 5 campioni di siero stoccati immediatamente a -80°C (valore basale), o tenuti in frigo a +4°C per 1, 3, 5 e 10 giorni per poi essere conservati a -80°C fino al giorno dell'analisi.

3.10.10. Valutazione di matrici biologiche diverse

Sono state prelevate a 5 soggetti una provetta oca da siero con attivatore della coagulazione e gel separatore (valore basale), una provetta rossa da siero con attivatore della coagulazione senza gel separatore e una provetta lilla con anticoagulante EDTA-3K.

3.10.11. Comparabilità tra metodi

Sono stati analizzati 40 campioni di siero con richiesta di 17-OHP ed analizzati con il metodo LC-MS/MS. Si sono confrontati i risultati con il metodo utilizzato in routine (range di misura 0,45-60,6 nmol/L, con una imprecisione dichiarata dal produttore <10%) e valutata la differenza con la regressione di Passing Bablok.

4. RISULTATI

4.1. Analisi cromatografica

Dopo l'ottimizzazione delle transizioni di massa, si ottengono due picchi cromatografici corrispondenti al 17-OHP e al $^{13}\text{C}_3$ -17-OHP al tempo di ritenzione 3,20 minuti. Nel grafico 1. sono riportati i cromatogrammi relativi al 17-OHP 10,0 nmol/L e all'IS 50 $\mu\text{g/L}$.

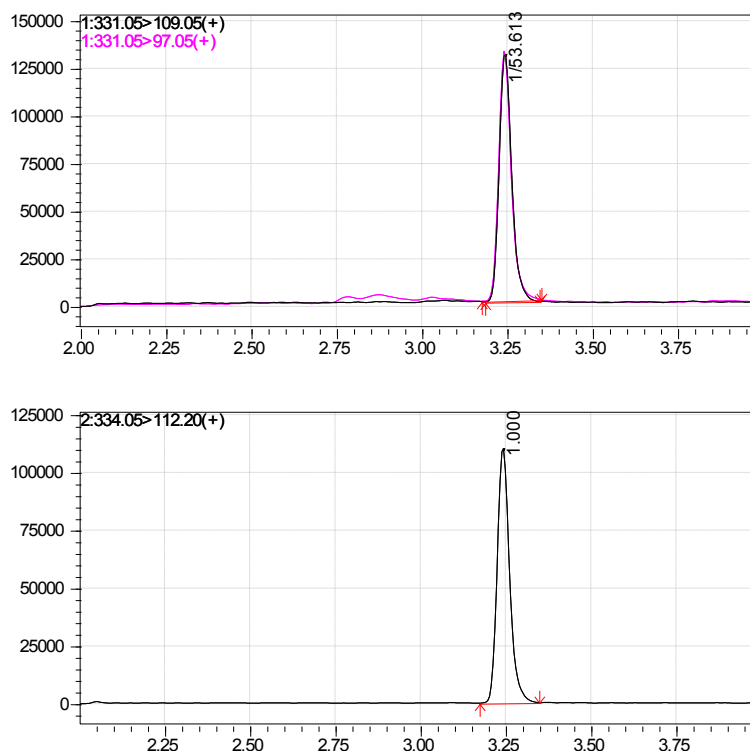


Grafico 1. Cromatogrammi MS/MS corrispondenti alla frammentazione degli ioni. In alto il cromatogramma del 17-OHP delle transizioni di massa 331,05 \rightarrow 97,05 (in rosa) e della transizione di massa 331,05 \rightarrow 109,05 (in nero). In basso il cromatogramma del $^{13}\text{C}_3$ 17-OHP della transizione di massa 334,05 \rightarrow 112,20.

4.2. Ottimizzazione del metodo e comparabilità tra le preparative in colonnina e in micropiastra

Avvalendosi di prove di stima dell'inesattezza, come prove di recupero, per assicurarsi di modificare il metodo senza bias, le prime variazioni apportate con successo nella preparativa dei campioni sono state la diminuzione del volume di caricamento del surnatante da 350 μL a 150 μL , la semplificazione dei passaggi SPE da 2 lavaggi con acqua distillata ultrapura e soluzione 30% metanolo a 3 lavaggi con un'unica soluzione 25% metanolo e la diminuzione del volume di eluizione da 200 μL a 150 μL .

La principale complicazione, individuata durante l'ottimizzazione del metodo, è stato l'elevato rumore di fondo nei cromatogrammi in tutti i campioni analizzati. È stata risolta con le modificazioni

della preparativa e l'uso delle piastre SPE, ma causando una bassa risoluzione dei picchi cromatografici (vedi Grafico 2.). Per aumentare la risoluzione è stata modificata la matrice dell'eluato finale, correggendo la polarità che interagiva fortemente con la fase stazionaria, diluendo i campioni 1:2 con acqua distillata ultrapura, prima dell'inserimento nell'autocampionatore.

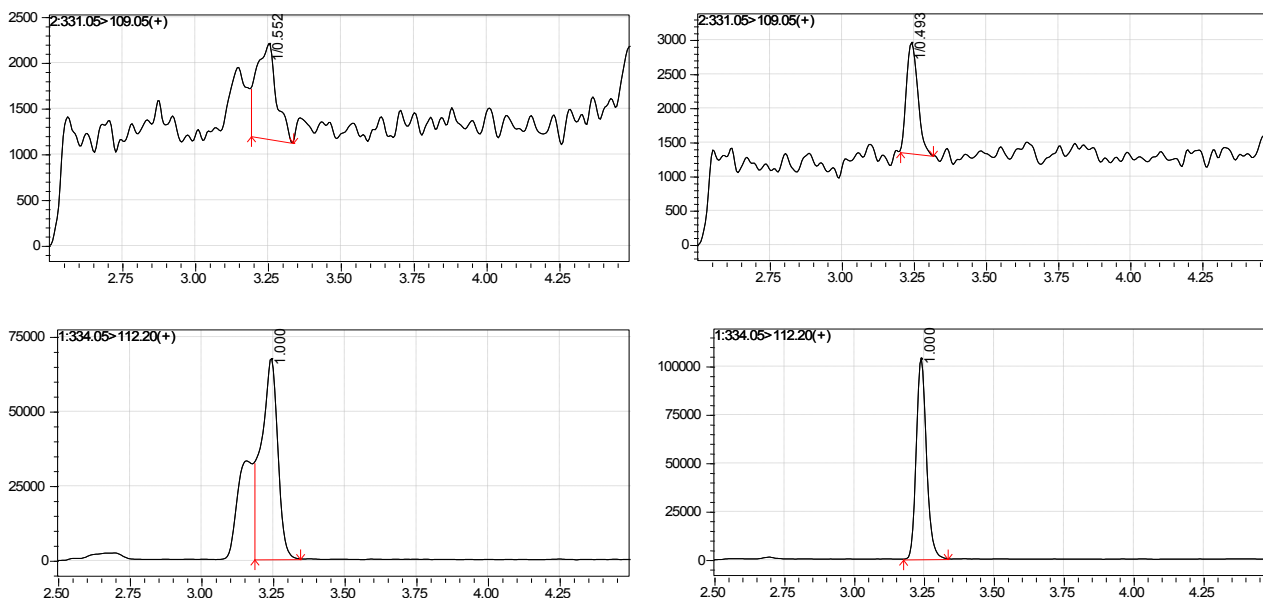


Grafico 2. In alto cromatogrammi del 17-OHP, in basso cromatogrammi del ¹³C₃ 17-OHP. I picchi riportati a sinistra hanno una bassa risoluzione (“spalla” a sinistra dei picco). I cromatogrammi a destra hanno un picco ben risolto.

Comparabilità tra le preparative. Per il passaggio alla preparativa in piastra è stata effettuata una comparabilità del metodo allestito in colonnine SPE e del metodo in piastre su 40 campioni di pazienti analizzati in parallelo. Il passaggio al metodo in micropiastra ha portato a modifiche significative come il cambio di centrifuga, la velocità e il tempo della centrifugazione finale della PP e dei passaggi di lavaggio e di eluizione dell'SPE.

In grafico 3. è riportata la regressione lineare di Passing-Bablok .

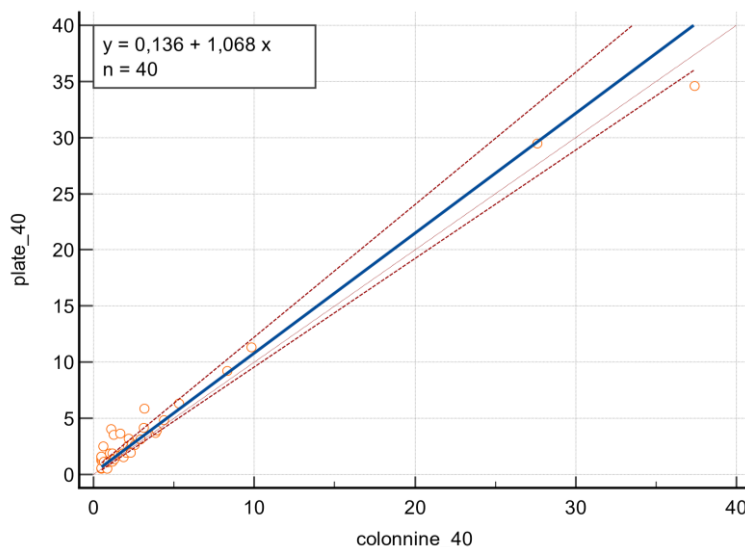


Grafico 3. Analisi di Passing Bablok, correlazione del metodo in colonnine e in piastra.

La regressione di Passing Bablok ha dato una equazione di $y = 0,14 + 1,07x$. Gli intervalli di confidenza al 95% della pendenza e dell'intercetta sono risultati non statisticamente significativi in quanto vanno da 0,96 a 1,18 e da -0,08 a 0,44, rispettivamente.

4.3. Prove di validazione

4.3.1. Curva di calibrazione e range di linearità

I 7 livelli dei calibratori ottenuti dalla diluizione seriale dello standard sono: 0,5 nmol/L, 1,0 nmol/L, 2,5 nmol/L, 5,0 nmol/L, 10,2 nmol/L, 50,5 nmol/L, 100,8 nmol/L.

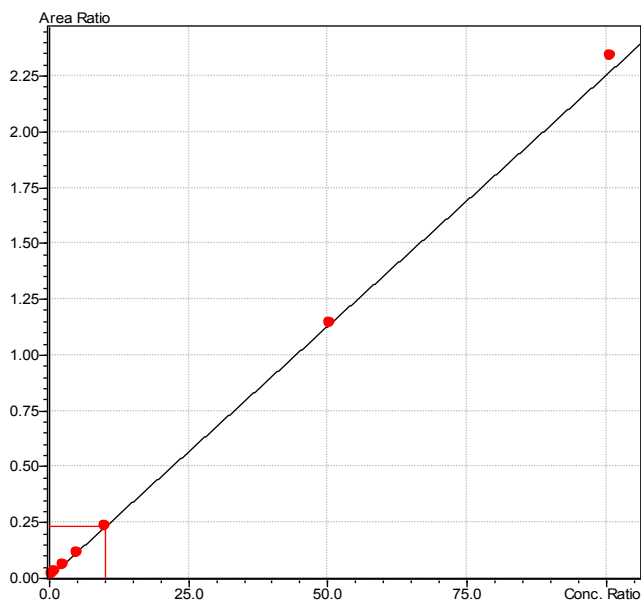


Grafico 4. Curva di calibrazione.

Come mostra il Grafico 4, l'equazione della curva di calibrazione è la regressione lineare: $y = 0.022x + 0.0057$, dove sull'asse delle ascisse vi è la concentrazione dell'analita e sull'asse delle ordinate il rapporto tra segnale dello standard e dello standard interno. Il coefficiente di determinazione è $r^2 = 0.998$; il range di misura analitico con questa curva è 0,5-100,8 nmol/L.

4.3.2 Specificità

Nel Grafico 5. è mostrata la separazione del 17-OHP dal principale composto isobaro 11-DOC.

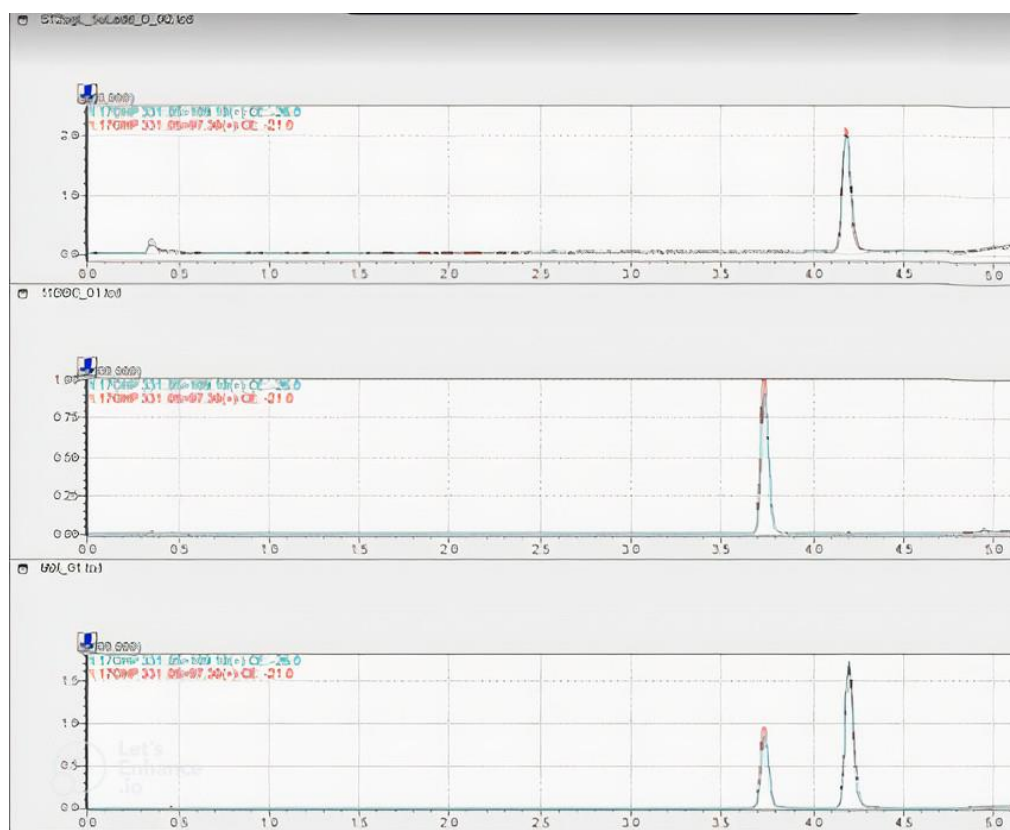


Grafico 5. Dall'alto al basso: cromatogramma del 17-OHP che eluisce al tempo di ritenzione 4,2 minuti, cromatogramma dell'11-DOC che eluisce al tempo di ritenzione 3,7 minuti, cromatogramma della separazione del 17-OHP e dell'11-DOC. È stato utilizzato un pre-filtro in colonna.

4.3.3. Limite di quantificazione

I risultati relativi all'imprecisione intra-serie di un CQI diluito 1:4 per ottenere una concentrazione nell'intorno del LLOQ, ripetuto 10 volte sono riportati in Tabella VIII:

Tabella VIII. Stima del LLOQ, in nmol/L.

N	MEDIA	DS	CV%
10	0,69	0,096	14

4.3.4. Inesattezza

La Tabella IX. mostra i risultati VEQ LC-MS/MS, il CV% e il bias % riferito alla media dei laboratori.

Tabella IX. Risultati VEQ.

VEQ	Risultato LC-MS/MS	Media dei lab che utilizzano LC-MS/MS	n laboratori	CV%	range accettabilità		bias %
IH15B	12,57	11,5	27	7,5	8,01	15	11
IH13B	21,77	19,49	30	9,8	13,59	25,4	12

4.3.5. Stima dell'inesattezza

Prove di recupero. La Tabella X. mostra i recuperi % e medi ottenuti nei 4 campioni con 3 livelli di arricchimento.

Tabella X. Prova di recupero di 4 campioni arricchiti con 1, 5, 10 nmol/L di 17-OHP.

Campione	Data	Conc. endogena (nmol/L)	Arricchimento 1 nmol/L	Arricchimento 5 nmol/L	Arricchimento 10 nmol/L
			Recupero %		
A	31/05/2022	3,65	112	99	104
B	31/05/2022	0,85	95	103	114
C	21/06/2022	0,63	101	97	99
D	07/07/2022	1,00	109	106	101
RECUPERO MEDIO %			104	101	105

Prove di diluizione. In Tabella XI. sono riportati i risultati in termini di recupero % dei 3 campioni arricchiti a 40 nmol/L e diluiti con fattori di diluizione 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 in fisiologica.

Tabella XI. Prove di diluizione, 3 campioni diluiti 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16.

Campione	Fattore di diluizione			
	2	4	8	16
	RECUPERO %			
A	101	100	106	101
B	99	99	100	107
C	102	97	101	106
RECUPERO MEDIO %	101	99	102	105

4.3.6. Imprecisione

Ripetibilità (imprecisione intra-serie). I risultati sono presentati nella Tabella XII. in termini di media, DS e CV%.

Tabella XII. Ripetibilità intra-assay, in nmol/L.

Campione	Data	N	MEDIA	DS	CV%
SIERO I	19/5/2022	10	1,15	0,120	10
CQI I	9/6/2022	10	1,86	0,162	9
CQI II	9/6/2022	10	4,43	0,141	3
CQI III	9/6/2022	10	19,72	0,593	3

Riproducibilità (imprecisione inter-serie). I risultati sono presentati in termini di media, DS e CV% nella Tabella XIII.

Tabella XIII. Riproducibilità inter-assay, in nmol/L, dal 9 giugno al 31 agosto 2022.

Campione	N	MEDIA	DEV.ST	CV%
CQI I	30	2,15	0,30	14
CQI II	28	4,58	0,51	11
CQI III	31	15,81	1,76	11

4.3.7. Effetto matrice

L'effetto matrice calcolato sul bianco e sul campione A è risultato sempre inferiore al 20% (ME%_{BLK}= 103%, ME%_A= 117%, media dei ME%= 110%).

4.3.8. Stabilità dei campioni processati

I risultati relativi alle prove di stabilità dei 11 campioni processati, mantenuti nell'autocampionatore a 8°C e ri-iniettati dopo 1 e 2 giorni dalla prima analisi sono riportati in termini di media e variazione percentuale nella Tabella XIV.

Tabella XIV. Concentrazione di 17-OHP di 11 campioni iniettati il giorno della preparativa (G0) e ri-iniettati i 2 giorni successivi (G1 e G2). È stata calcolata la variazione percentuale.

Campioni	G0 nmol/L	G1 nmol/L	G2 nmol/L	MEDIA nmol/L	Δ% G1 vs G0	Δ% G2 vs G0
SIERO 1	9,72	8,86	8,97	9,18	91	92
SIERO 2	1,47	1,47	1,2	1,38	100	85
SIERO 3	2,50	2,29	2,26	2,35	92	90
SIERO 4	6,62	6,44	6,3	6,45	97	95
SIERO 5	5,72	5,71	5,74	5,72	100	100
SIERO 6	9,52	9,29	9,39	9,4	98	99
SIERO 7	6,29	5,84	6,48	6,2	93	103
SIERO 8	0,93	0,96	1,05	0,98	103	113
SIERO 9	3,01	2,78	2,75	2,85	92	91
SIERO 10	4,36	3,91	3,84	4,04	90	88
SIERO 11	7,86	7,81	7,84	7,84	99	100
MEDIA %					96	98

4.3.9. Stabilità pre-analitica

I risultati relativi alle prove di stabilità pre-analitica sono riportati in termini di media, DS e CV% (Tabella XV.).

Tabella XV. Concentrazioni di 17-OHP in nmol/L al giorno 0 e dopo 1, 3, 5, 10 giorni in cui i campioni sono stati mantenuti a +8°C.

Campioni nmol/L	G0	G1	G3	G5	G10	MEDIA	DS	CV%
A	3,37	3,14	3,25	3,11	3,32	3,24	0,11	3
B	1,2	1,41	1,21	1,47	1,34	1,33	0,12	9
C	1,81	1,64	1,59	1,66	1,71	1,68	0,08	5
D	1,03	1,02	1,15	-	1,19	1,14	0,12	11
E	0,65	0,7	0,76	0,74	-	0,71	0,05	7

I risultati delle variazioni percentuali rispetto al giorno zero sono rappresentati in Tabella XVI., con la media e la DS delle variazioni % per soggetto. La media di variazione % totale è risultata di 104%.

Tabella XVI. Errore percentuale dei campioni ai vari giorni rispetto al giorno zero.

Campioni	Δ% G1 vs G0	Δ% G3 vs G0	Δ% G5 vs G0	Δ% G10 vs G0	MEDIA %	DS %
A	93	96	92	98	95	2,9
B	117	101	122	112	113	9,3
C	91	88	92	94	91	2,7
D	99	112	-	115	113	4,7
E	108	117	114	-	109	8,6

4.3.10. Valutazione di matrici biologiche diverse

I risultati delle prove sulle diverse matrici sono riportati in termini di media, DS e CV% come mostra la Tabella XVII.

Tabella XVII. Concentrazione di 17-OHP in nmol/L ottenute da 5 campioni raccolti su matrici biologiche diverse, (Provetta ocra da siero con attivatore della coagulazione e gel separatore -valore basale-, provetta rossa da siero con attivatore della coagulazione senza gel separatore e provetta lilla con anticoagulante EDTA-3K).

Campioni	OCRA	ROSSO	LILLA	MEDIA	DS	CV%
A	3,37	3,29	2,93	3,2	0,23	7,2
B	1,2	1,35	1,4	1,32	0,1	7,6
C	1,81	1,60	1,98	1,71	0,33	19,2
D	1,03	1,12	1,06	1,07	0,05	4,7
E	0,65	0,69	0,7	0,68	0,03	4,4

I risultati delle variazioni percentuali delle due matrici in prova rispetto alla matrice di riferimento siero con gel separatore sono indicati in Tabella XVIII. La media di variazione % per il siero senza gel è di 103%, mentre quella del plasma di 105%.

Tabella XVIII. Variazioni percentuali delle due matrici in prova rispetto al siero con gel separatore

Campioni	$\Delta\%$ SIERO SENZA GEL VS SIERO CON GEL	$\Delta\%$ PLASMA EDTA3K VS SIERO CON GEL
A	98	87
B	112	117
C	88	109
D	109	103
E	106	108

4.3.11. Comparabilità tra metodi

I risultati ottenuti sui 40 campioni di pazienti con richiesta di 17-OHP tra il metodo in routine e il metodo LC-MS/MS sono stati elaborati con la regressione di Passing Bablok. (vedi Grafico 6.)

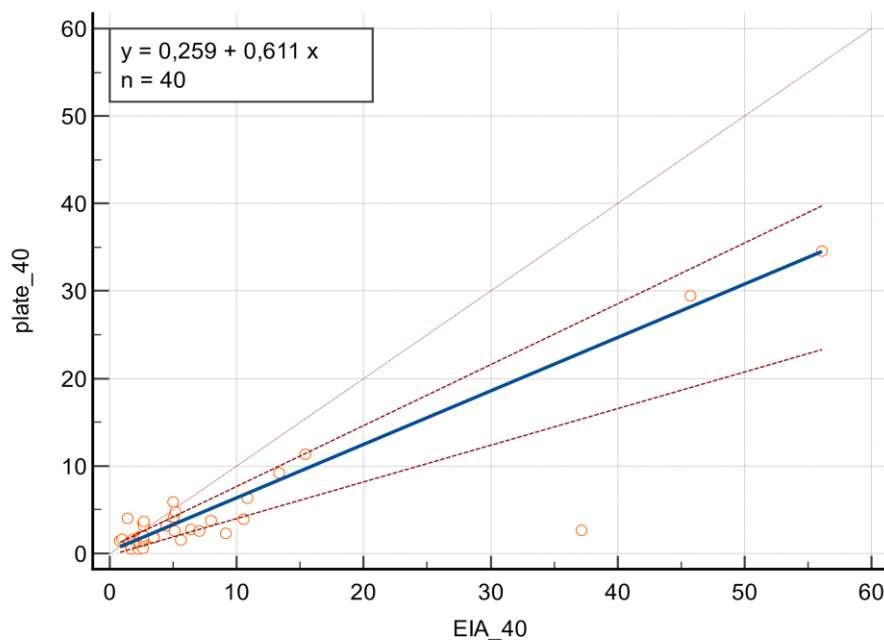


Grafico 6. Regressione Passing-Bablok.

La regressione di Passing Bablok ha dato una equazione di $y = 0,61x + 0,26$. Gli intervalli di confidenza al 95% della pendenza e dell'intercetta vanno da 0,42 a 0,69 e da -0,19 a 0,71, rispettivamente, dando quindi un bias proporzionale statisticamente significativo.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo sviluppo di un metodo in LC-MS/MS per la determinazione dei livelli sierici di 17-OHP è di grande interesse per l'endocrinologia. Il 17-OHP è importante nella diagnosi e nel monitoraggio, nella diagnosi differenziale del CAH late onset e della PCOS, nella diagnosi degli iperandrogenismi e pubertà precoce, nella diagnosi e lateralizzazione di tumori androgeno-secerntenti e infine nel follow-up post-chirurgico. I vantaggi della cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa tandem rispetto ai metodi tradizionali immunometrici garantiscono quindi risultati più accurati vista l'elevata specificità del metodo LC-MS/MS. I metodi LC-MS/MS sono infatti i metodi di riferimento per l'analisi degli steroidi [12] [13].

Un metodo in LC-MS/MS però non è necessariamente garanzia di accuratezza analitica, soprattutto quando viene sviluppato home-made [26]. È fondamentale quindi che il metodo sia sottoposto a una rigorosa validazione e che i risultati ottenuti siano conformi ai requisiti delle principali linee-guida internazionali [20].

Inizialmente sono state apportate delle modifiche alla preparativa al fine di poterla implementare su un preparatore automatico di liquidi presente in laboratorio. I vari passaggi dovevano prevedere quindi l'uso di micropiastre e non più vials e colonnine. Inoltre, si sono dovuti rivedere i volumi di reazione in quanto l'utilizzo del preparatore automatico deve prendere in considerazione dei volumi morti che lavorando manualmente non sono presenti. Le varie modifiche e l'ulteriore ottimizzazione della preparativa ha consentito di abbassare il rumore di fondo nei cromatogrammi (grazie all'aggiunta di acqua nell'eluato finale), migliorando la sensibilità analitica grazie ad un migliore rapporto segnale/rumore di fondo passare da cromatogrammi, riuscendo ad ottenere un procedimento implementabile sul preparatore automatico di liquidi.

Il metodo è stato validato secondo le linee guida internazionali FDA e CLSI [21] [17]. Il range di misura analitico (0,5-100,8 nmol/L) risulta idoneo in base ai valori attesi nei campioni dei pazienti.

Rispetto al metodo immunometrico utilizzato in routine, la LC-MS/MS non presenta cross-reattività con metaboliti simili. La prova di specificità ha evidenziato che la metodica non presenta interferenze al tempo di ritenzione del 17-OHP. Uno dei principali metaboliti che si ritrova nelle analisi come analita interferente è l'isobaro 11-DOC e dalla prova eseguita si evidenzia che i due analiti risultano ben risolti e separati (Grafico 5).

L'analisi LLOQ con concentrazione 0,5 nmol/L dei replicati biologici ha determinato un coefficiente di variazione del 14%. Questo valore rientra perfettamente nelle linee guida ($CV\% \leq 20\%$) [21], si può pertanto affermare che il metodo sviluppato ha una sensibilità analitica accettabile.

Secondo l'FDA ed EMA, l'accuratezza dei metodi cromatografici dovrebbe essere inferiore al 15% [21] [22]. I report dei laboratori che hanno utilizzato i metodi LC-MS/MS su 2 campioni del programma di qualità VEQ, per la determinazione del 17-OHP, hanno permesso di definire una misura di bias del metodo. Infatti, i risultati possono essere considerati soddisfacenti, se osserviamo che il bias ottenuto è inferiore al 15%. Questo valore indica l'inaccuratezza percentuale degli scostamenti rispetto alla media di consenso; pertanto, si può affermare che il metodo utilizzato è nella mediana del report.

Oltre al calcolo del bias delle VEQ appena discusso, si sono eseguite stime dell'inesattezza attraverso prove di diluizione e recupero. I risultati di queste prove sono idonei in base alle linee guida CLSI C62-A [17], rientrando nel range di accettabilità del $100 \pm 15\%$. I recuperi medi percentuali ottenuti dalle prove di diluizione sono compresi fra il 99% e il 105%, mentre quelli derivati dalle prove di recupero sono inclusi in un intervallo che va 104% al 105%.

L'imprecisione di un metodo LC-MS/MS, sempre secondo le linee guida dell'FDA ed EMA, deve essere inferiore al 15% [21] [22]. I risultati soddisfano questo criterio di accettabilità, avendo ottenuto i CV intra-assay da 3% a 10% e una imprecisione inter-assay da 11% a 14%. Questa prova di imprecisione garantisce che le rilevazioni risultino stabili sia in una stessa seduta analitica che confrontando procedure eseguite in differenti giorni.

L'effetto matrice medio calcolato di 110% rientra nell'intervallo FDA ($100 \pm 20\%$) [21] e perciò si deduce che la soppressione ionica o l'ion enhancement rientrano nell'accettabilità di una analisi in LC-MS/MS. In ogni caso, l'utilizzo di uno standard interno marcato con isotopo stabile normalizza per eventuali campioni in cui questo effetto sia più marcato.

I risultati delle prove di stabilità hanno dimostrato che i campioni di siero processati per la determinazione del 17-OHP sono stabili all'interno dell'autosampler dello strumento a $+8^\circ\text{C}$. È possibile conservare il siero a questa temperatura fino a 2 giorni dopo la preparazione. Questa stabilità dimostrata può permettere quindi in routine di ri-iniettare dei campioni qualora ce ne sia la necessità, senza doverli ri-preparare. Questa possibilità è molto vantaggiosa per una analisi gestita non random access.

I campioni raccolti possono essere conservati fino a 10 giorni se conservati a +4°C come ottenuto dalle prove della stabilità pre-analitica. Questa stabilità permette quindi di conservare i campioni a +4°C tra una seduta e l'altra, visto che la frequenza di analisi non sarà giornaliera, ma settimanale.

Per quanto riguarda i dati ottenuti sulle matrici, siero con gel separatore, siero senza gel separatore e plasma EDTA, non si sono evidenziate differenze significative, ma il numero dei campioni su cui è stata eseguita l'analisi è esiguo. Attualmente in routine vengono accettati solo campioni ottenuti da provette di siero con gel separatore. Volendo valutare la possibilità di accettare altri tipi di matrici biologiche andranno estese queste prove.

Come atteso da dati di letteratura [12], i risultati delle prove di comparabilità del metodo LC-MS/MS con il metodo immunochemiluminescente utilizzato in routine, hanno evidenziato che le due metodiche non sono comparabili, né tanto meno correlate. Gli intervalli di confidenza al 95% della pendenza della regressione di Passing Bablok vanno da 0,42 a 0,69. Inoltre, da questo confronto emerge che il metodo immunometrico utilizzato a volte dà risultati superiori e altre volte inferiori rispetto al metodo LC-MS/MS.

In conclusione, tutte le prestazioni analitiche ottenute dalle prove di validazione soddisfano i criteri di accettabilità richiesti dalle linee-guida internazionali e risultano paragonabili ai più recenti lavori presenti in letteratura [13]. Per implementare questo metodo in routine bisognerà procedere con la fase di automazione della preparativa sul preparatore automatico di liquidi e si dovranno valutare gli intervalli di riferimento da adottare, tramite verifica o nuova definizione come descritto nella CLSI EP28 [27].

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Kleine B. e Rossmann W. G. *Hormones and the Endocrine System*. Switzerland: © Springer International; 2016.
- [2] Häggström M. e Richfield D. *Diagram of the pathways of human steroidogenesis*. WikiJournal of Medicine; 2014.
- [3] Witchel S. F. *Congenital Adrenal Hyperplasia*. *Journal of pediatric and adolescent gynecology*; 2017. 30(5), 520–534. Disponibile all'indirizzo:
<https://doi.org/10.1016/j.jpag.2017.04.001>
- [4] McPherson R. A. e Pincus M. R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc; 2017.
- [5] Igaz P. *Practical Clinical Endocrinology*. Switzerland: ©Springer International, 2021.
- [6] Speiser P., Azziz R., Baskin L., Ghizzoni L., Hensle T., Merke D., Meyer-Bahlburg H., Miller W., Montori V., Oberfield S., Ritzen M., White P. e Society; *Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society clinical Practice Guideline*; 2010. 95(9), 4133–4160. Disponibile all'indirizzo:
<https://doi.org/10.1210/jc.2009-2631>
- [7] New M. I. *Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency*. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*; 2006. 91(11), 4205–4214. Disponibile all'indirizzo:
<https://doi.org/10.1210/jc.2006-1645>
- [8] Chang R. J. *A practical approach to the diagnosis of polycystic ovary syndrome*. *American journal of obstetrics and gynecology*; 2004. 191(3), 713–717. Disponibile all'indirizzo:
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.04.045>
- [9] Pasquali R., Patton L., Pocognoli P., Cognigni G. E. e Gambineri A. *17-Hydroxyprogesterone Responses to Gonadotropin-Releasing Hormone Disclose Distinct Phenotypes of Functional Ovarian Hyperandrogenism and Polycystic Ovary Syndrome*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*; 2007. 92(11), 4208–4217. Disponibile all'indirizzo:
<https://doi.org/10.1210/jc.2007-0870>

- [10] Taylor A., Keevil B. e Hubtaniemi I. Mass spectrometry and immunoassay: how to measure. *Eur J Endocrinol*; 2015. 173(2), D1–D12. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0338>
- [11] Ciaccio M. e Lippi G. *Biochimica clinica e medicina di laboratorio*. EdiSES; 2017.
- [12] Fanelli F., Belluomo I., Di Lallo V. D., Cuomo G., De Iasio R., Baccini M., Casadio E., Casetta B., Vicennati V., Gambineri A., Grossi G., Pasquali R. e Pagotto U. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults. *Steroids*; 2011. 76(3), 244–253. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.11.005>
- [13] Debeljak Ž., Marković I., Pavela J., Lukić I., Mandić D., Mandić S., Horvat V. e Šerić V. Analytical bias of automated immunoassays for six serum steroid hormones assessed by LC-MS/MS. *Biochimica medica*; 2020. 30(3), 030701. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.11613/BM.2020.030701>
- [14] Zellner M., Winkler W., Hayden H., Diestinger M., Eliassen M., Gesslbauer B., Miller I., Chang M., Kungl A., Roth E. e Oehler R. Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelets. *Electrophoresis*; 2005. 26(12), 2481–2489. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1002/elps.200410262>
- [15] Thurman, Michael E. e Mills M. S. *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. University of California: Wiley; 1998.
- [16] Silvestre C. I., Santos J. L., Lima J. e Zagatto E. A. Liquid–liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Analytica chimica acta*; 2009. 652(1-2), 54–65. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.05.042>
- [17] CLSI C62 *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods*. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2022.
- [18] Strathmann F. G. e Hoofnagle A. N. Current and future applications of mass spectrometry to the clinical laboratory. *Am J Clin Pathol*; 2011. 136(4):609-616. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1309/AJCPW0TA8OBBNGCK>

- [19] McDonald J. G., Matthew S. e Auchus R. J. Steroid Profiling by Gas Chromatography–Mass Spectrometry and High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for Adrenal Diseases. *Hormones and Cancer*; 2011. 2(6), 324–332. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1007/s12672-011-0099-x>
- [20] D'Avolio A., Cantù M., Gervasoni J., Artusi C., Marinova M., Nonnato A., Cangemi G. e Persichilli S. Validazione dei metodi quantitativi bioanalitici in spettrometria di massa. *Biochimica Clinica*; 2018. 42(1), 51-61.
- [21] FDA Bioanalytical Method Validation. USA: Biopharmaceutics Food and Drug Administration; 2018.
- [22] EMA Guideline on bioanalytical method validation. EU: European Medicines Agency; 2011.
- [23] Passing H. e Bablok A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*; 1983. 21(11), 709–720. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1515/cclm.1983.21.11.709>
- [24] Waters. Analysis of Plasma 17-Hydroxyprogesterone, Androstenedione, and Cortisol Using a Novel Solid-Phase Extraction (SPE) Sorbent, Oasis PRIME HLB. for UPLC-MS/MS Analysis in Clinical Research. USA: Waters Corporation; 2015.
- [25] Shimadzu Corporation. <https://www.shimadzu.com/>
- [26] Antonelli G., Marinova M., Artusi C. e Plebani M. Mass spectrometry or immunoassay: est modus in rebus. *Clinical chemistry and laboratory medicine*; 2017. 55(9), 1243–1245. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0197>
- [27] CLSI EP28-A3c Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline. Clinical Laboratory Standards Institute; 2010.

