



SISMME



SISN



GENCLI

***Congresso congiunto
Pesaro 11-13 Ottobre 2006***

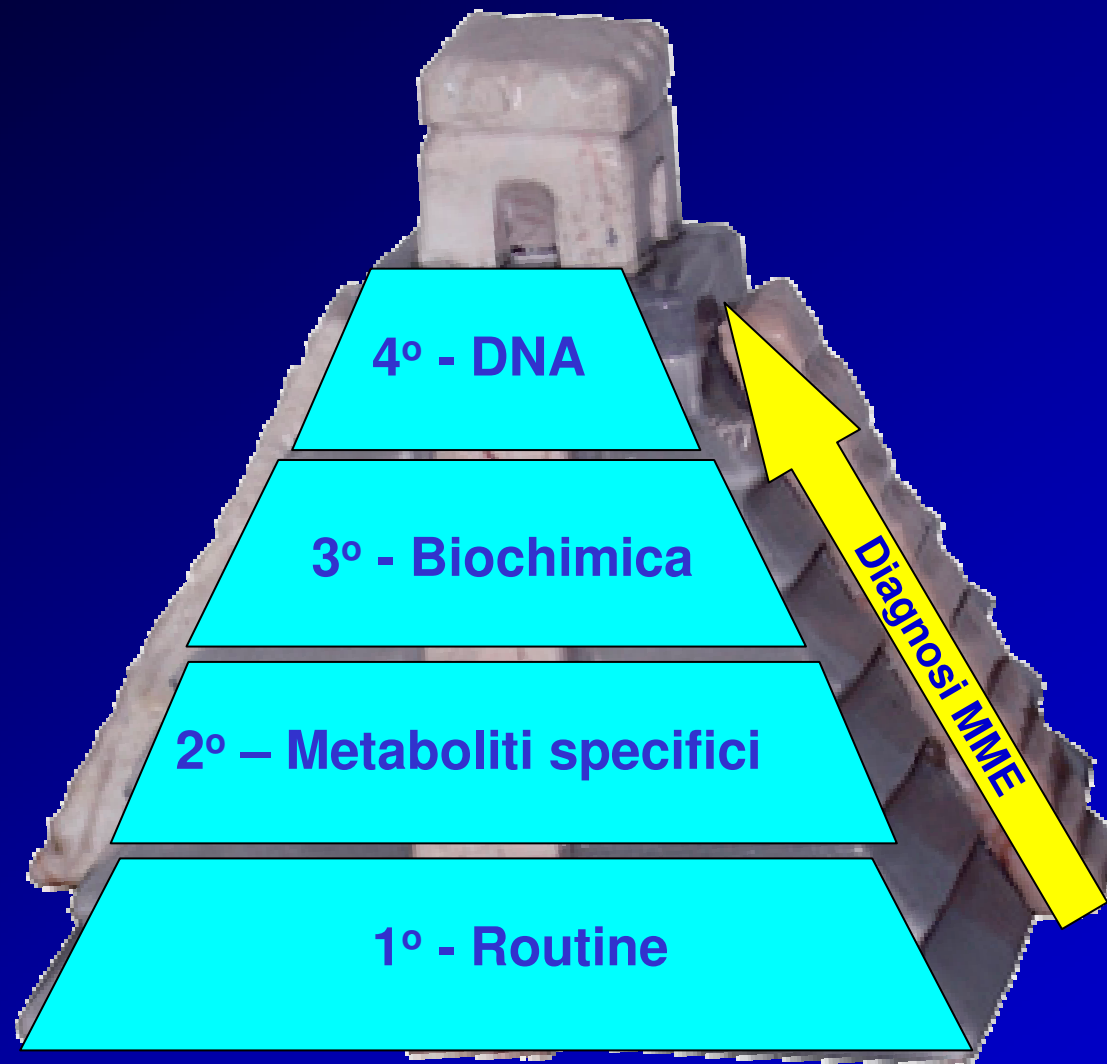
Strategie diagnostiche ed assistenziali come garanzia di qualità

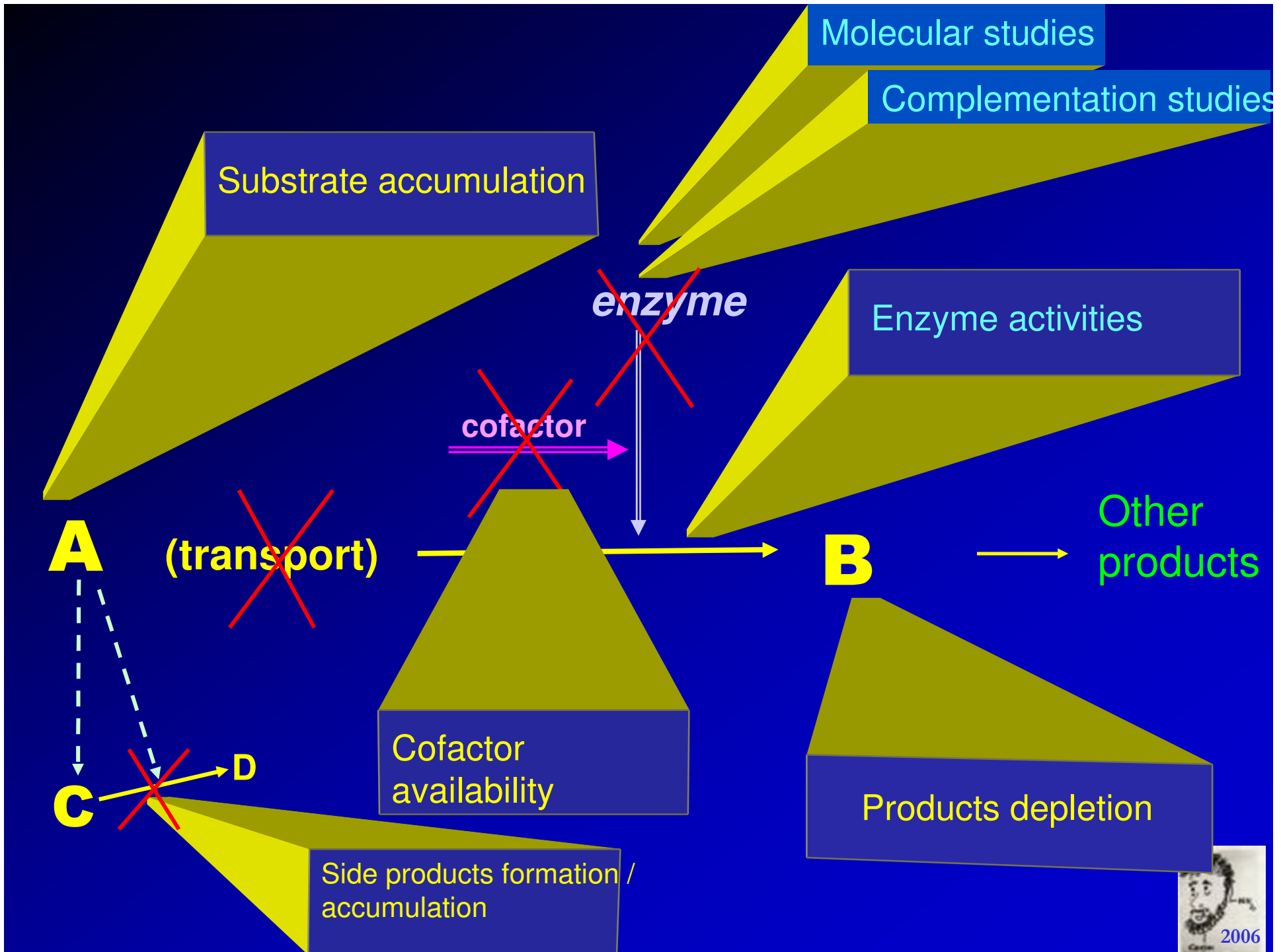
Sessione aggiornamento e formazione

“Diagnosi di laboratorio delle malattie metaboliche ereditarie”

**Diagnosi di laboratorio delle malattie metaboliche ereditarie
L'analisi dei metaboliti**

U. Caruso, AR. Fantasia, G. Migliaccio, A. Mascagni G. Minniti





Diagnosi di laboratorio di malattia metabolica

La diagnosi basata sullo studio dei metaboliti discende da:

- Segni di scompenso metabolico (↑ ammonio, ↓ glicemia, acidosi metabolica, ...)
- accumulo di metaboliti *critici* (substrati, precursori)
- accumulo di composti tossici secondari
- accumulo / escrezione di metaboliti di vie *alternative*



1° livello: parametri bioumorali di routine

| | | | Equilibrio acido-base | |
|------------------------------------|-----------|-----------|-----------------------|------------|
| | | | Glicemia | Ammoniemia |
| Difetti del ciclo dell'urea | = | ↑ / ↑ ↑ ↑ | = / ↑ | = / ↑ |
| Difetti di β-ossidazione | ↓ | = / ↑ | = / ↑ | = / ↑ |
| Acidosi organiche | ↓ / = / ↑ | = / ↑ ↑ ↑ | = / ↓ ↓ | ↑ |

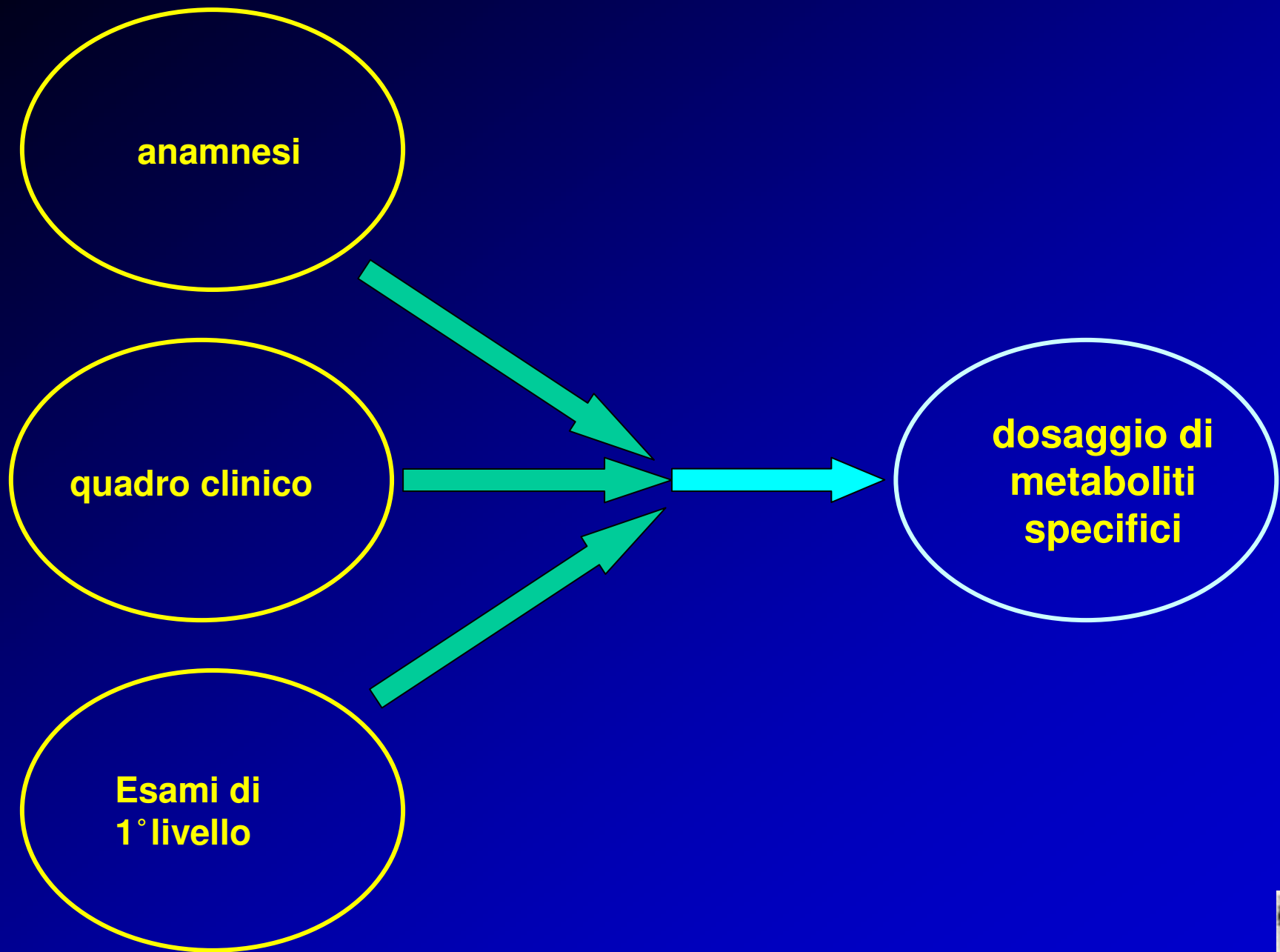


1° livello: parametri biumorali di routine - II

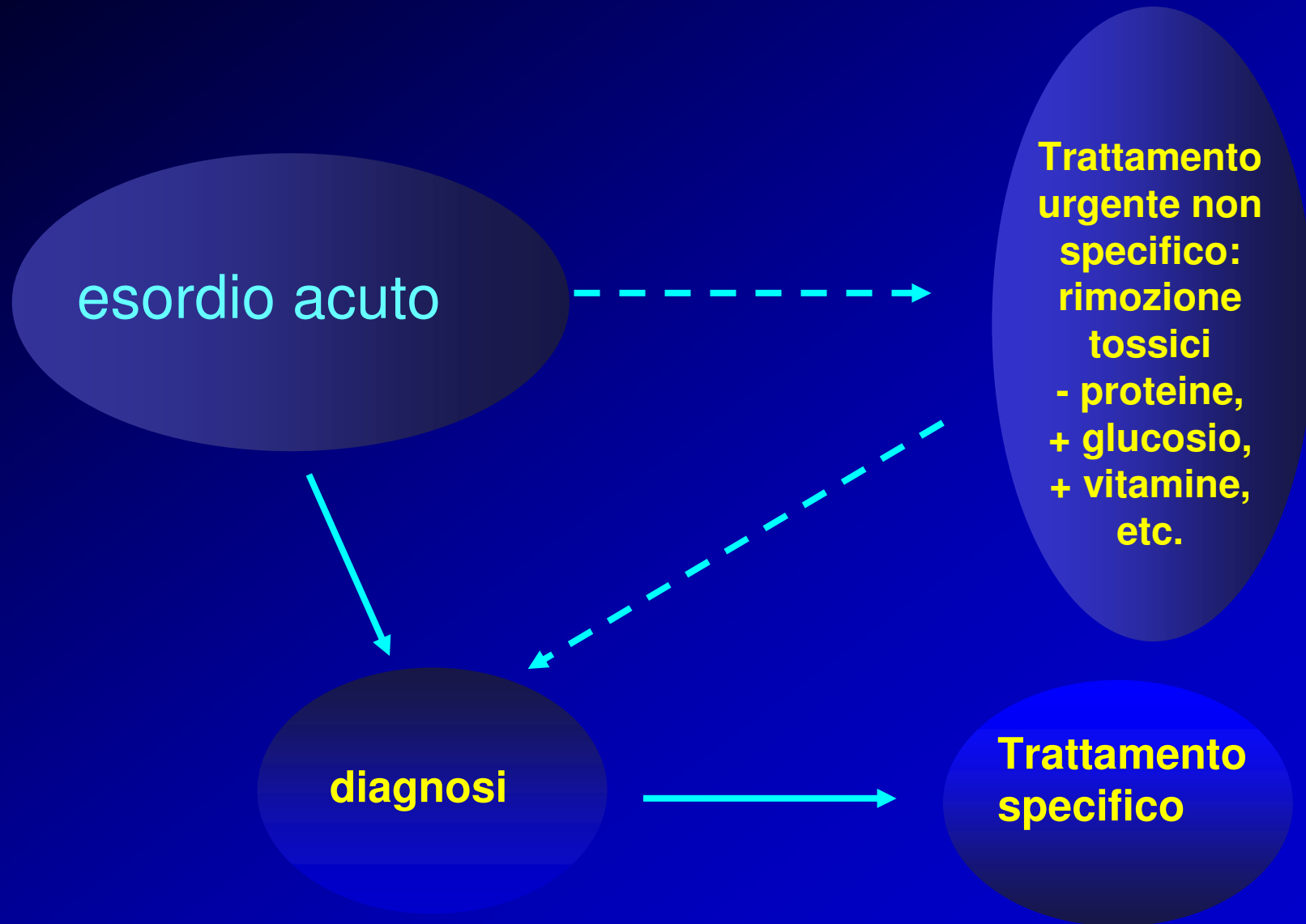
Altri parametri le cui alterazioni possono essere correlati a MME sono

- **gli indici di citolisi epatica (SGOT, SGPT, LDH, CK, ...)**
- **gli indici di funzionalità epatica (fattori della coagulazione, albumina e altre proteine di sintesi epatica)**
- **gli indici di funzionalità renale**
- **gli indici di colestasi**
- **i corpi chetonici**
- **l'acido urico**
- **etc**





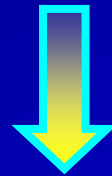
Malattie metaboliche a esordio acuto



Malattie metaboliche a esordio acuto

**In caso di rischio di exitus prima di una diagnosi
raccolgere:**

- plasma
- urine
- sangue intero (provetta e spot)
- biopsia cutanea / epatica



**Inviare immediatamente al laboratorio e/o conservare
in maniera adeguata (consiglio genetico)**



Malattie metaboliche a esordio acuto

**Scopo ultimo del processo diagnostico:
individuare, quanto prima, un *trattamento efficace***

Una *diagnosi completa* può non essere indispensabile, come primo passo, poiché alcuni approcci terapeutici sono efficaci per patologie simili.

Le indagini andranno poi completate per giungere alla diagnosi definitiva.



Diagnosi di laboratorio di malattia metabolica: i metaboliti

raggruppabili in **tre grandi categorie**, le cui caratteristiche chimico-fisiche costituiscono di norma la base delle metodologie di laboratorio utilizzate per la loro misura:

- **gli aminoacidi**
- **gli acidi**
- **i carboidrati**

(compresi derivati e polimeri)

- lipidi complessi
- purine e pirimidine
- alcoli
- ...



Diagnosi di laboratorio di malattia metabolica: le tecniche analitiche

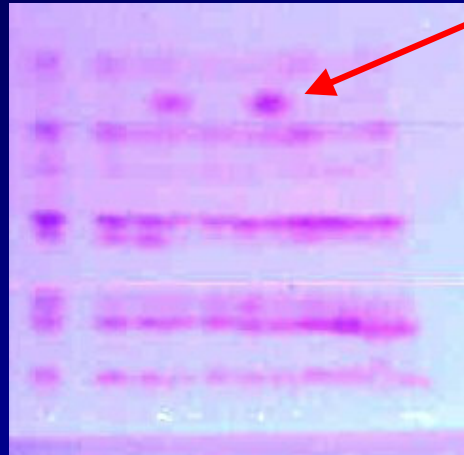
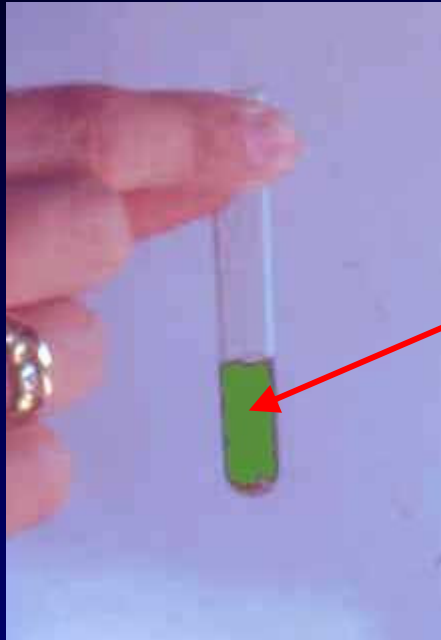
E' stato pressoché completamente abbandonato da anni lo schema
un esame → un analita

Le tecniche analitiche moderne sono generalmente basate su
tecniche separative:

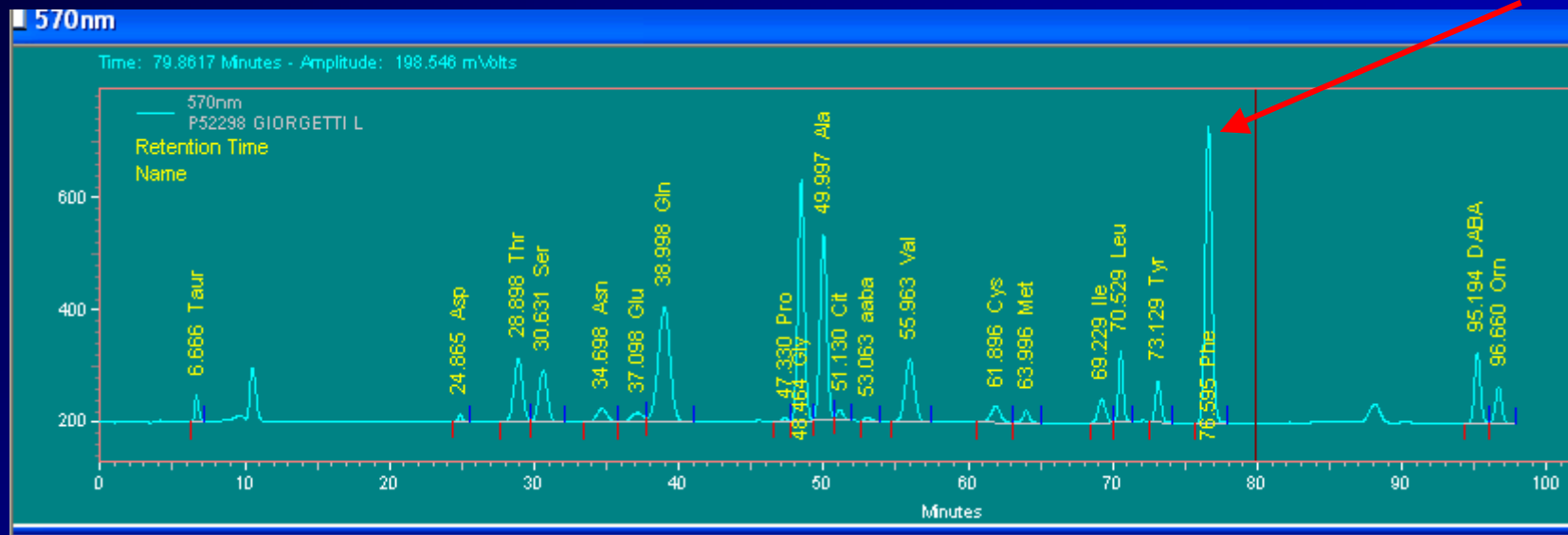
- cromatografia su carta (mono- e bi-dimensionale)
- cromatografia su strato sottile TLC (mono- e bi-dimensionale, su cellulosa, silice e altri tipi di supporti)
- cromatografia liquida su colonna (a scambio ionico, a fase inversa, etc)
- gascromatografia (a colonne impaccate, wide-bore, capillari...)
- elettroforesi capillare
- iso-electrofocusing
- ...



Evoluzione ...

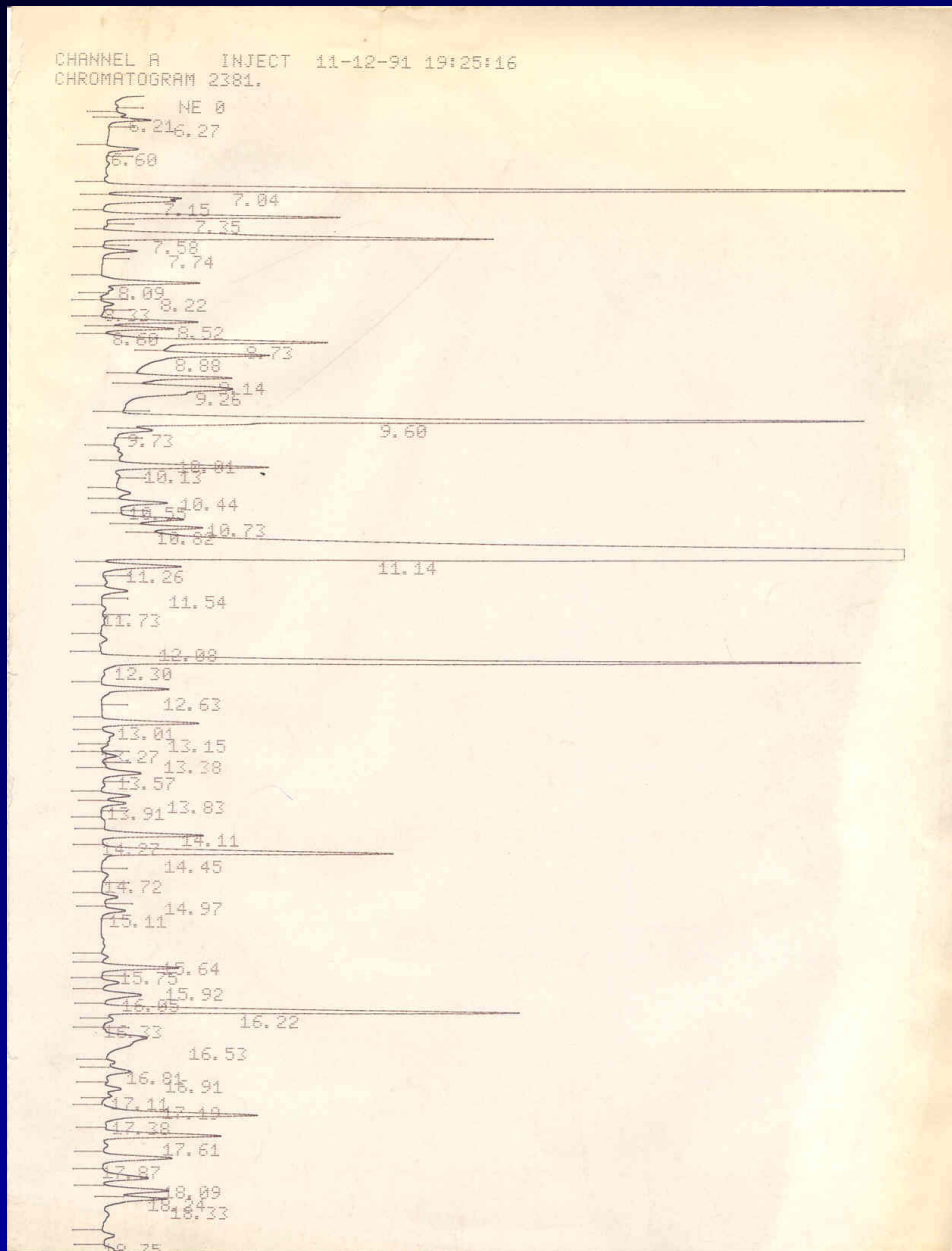


Evoluzione ...

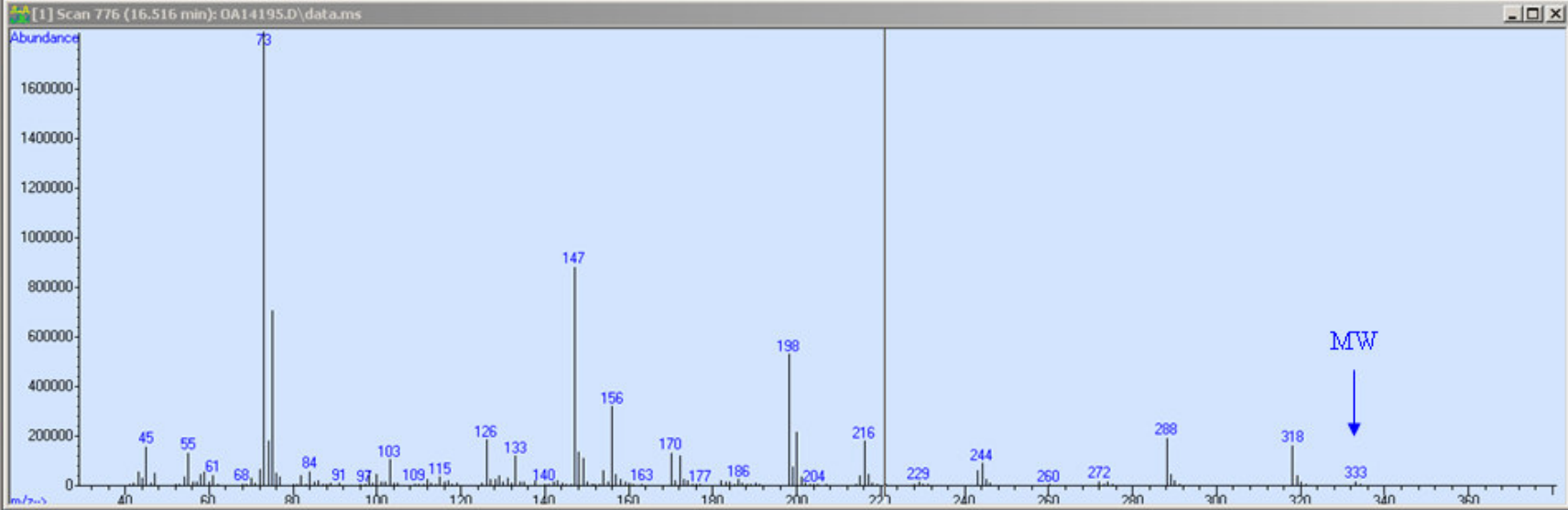
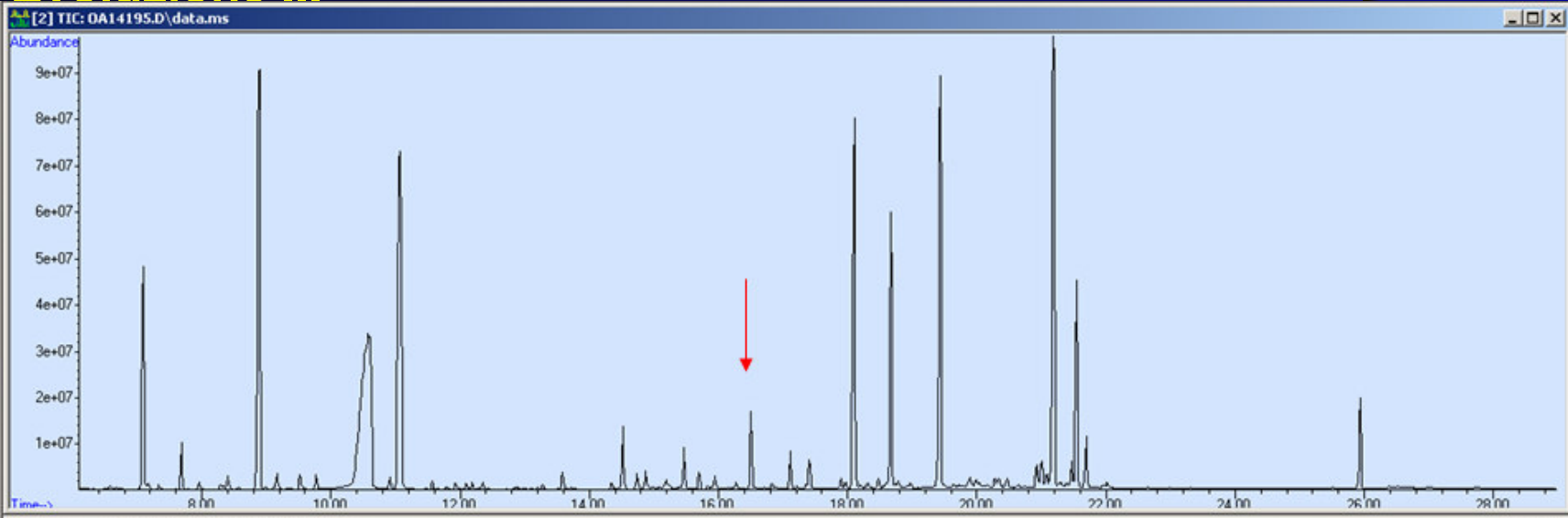


2006

Evoluzione ...



Evoluzione ...

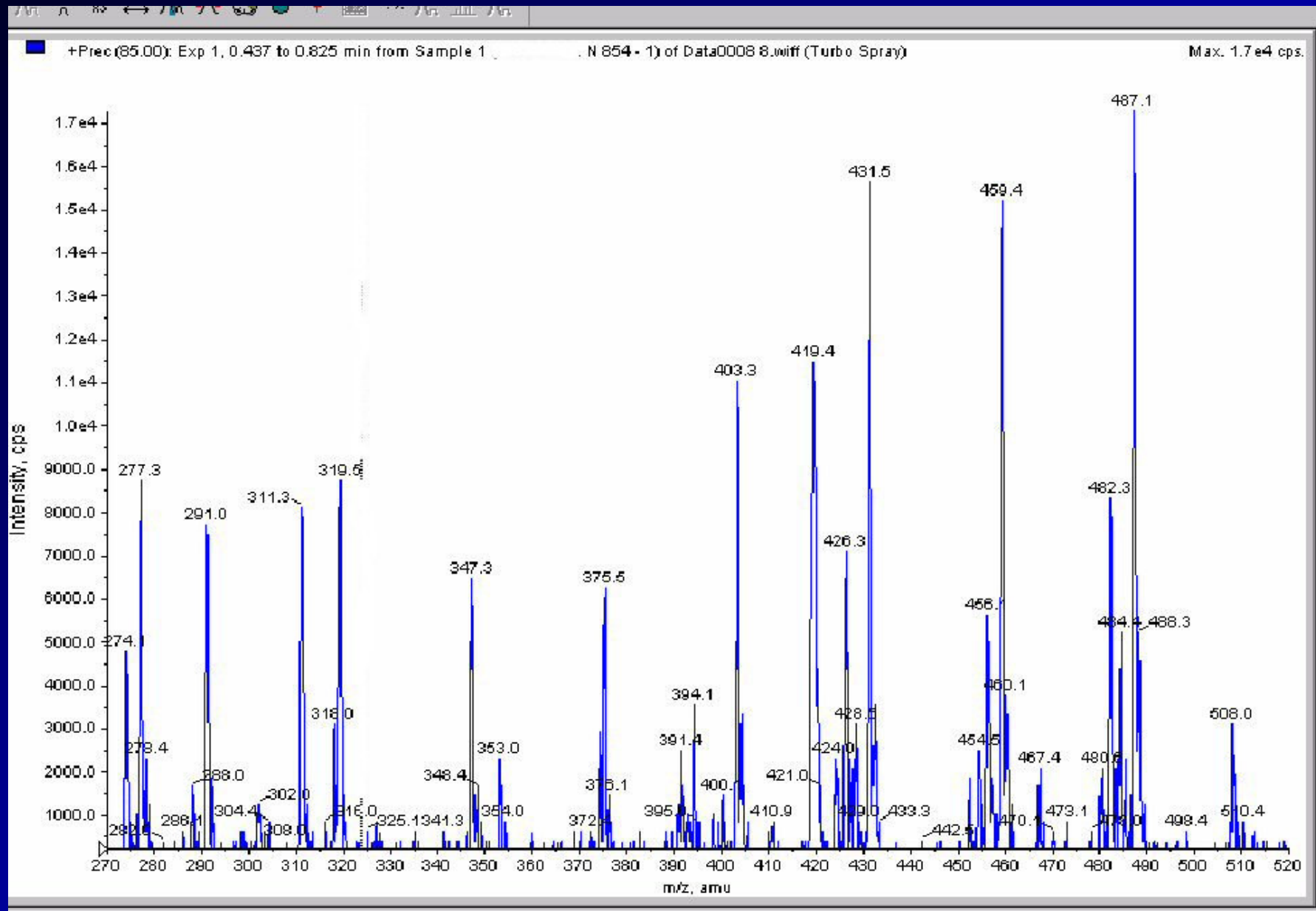


Window number 2 copied to the Clipboard

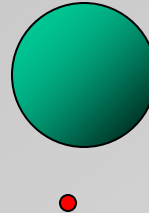
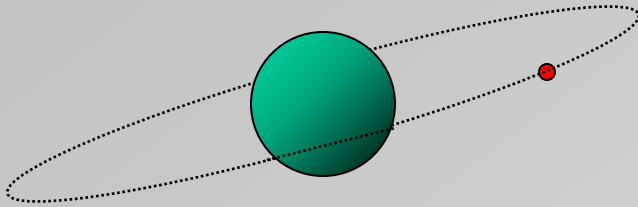


2006

Evoluzione ...



H - hydrogen



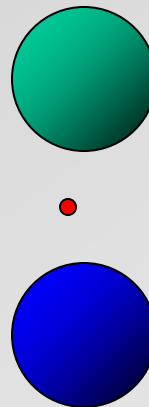
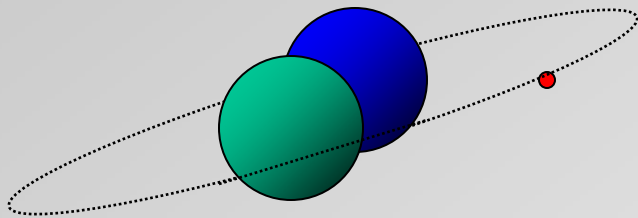
| charge | mass |
|--------|------|
|--------|------|

| | |
|---|---|
| 1 | 1 |
|---|---|

| | |
|----|---|
| -1 | 0 |
|----|---|

Hydrogen: atomic number = 1; mass = 1

D - deuterium



| charge | mass |
|--------|------|
|--------|------|

| | |
|---|---|
| 1 | 1 |
|---|---|

| | |
|----|---|
| -1 | 0 |
|----|---|

| | |
|---|---|
| 0 | 1 |
|---|---|

Deuterium: atomic number = 1; **mass = 2**



A compound labelled with one or more atoms of a stable isotope presents:

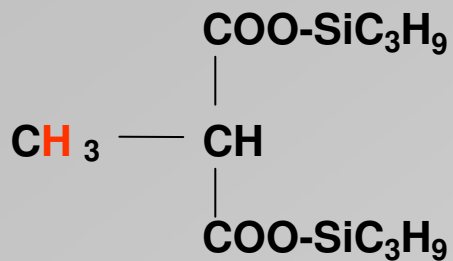
- the same chemical properties
- higher molecular mass

than the natural compound.

☞ Labelled compounds are used as internal standards.

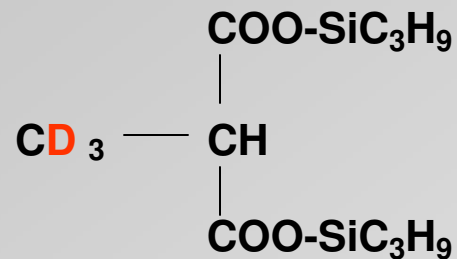
☞ MS can distinguish between natural and labelled compounds on the basis of the masses





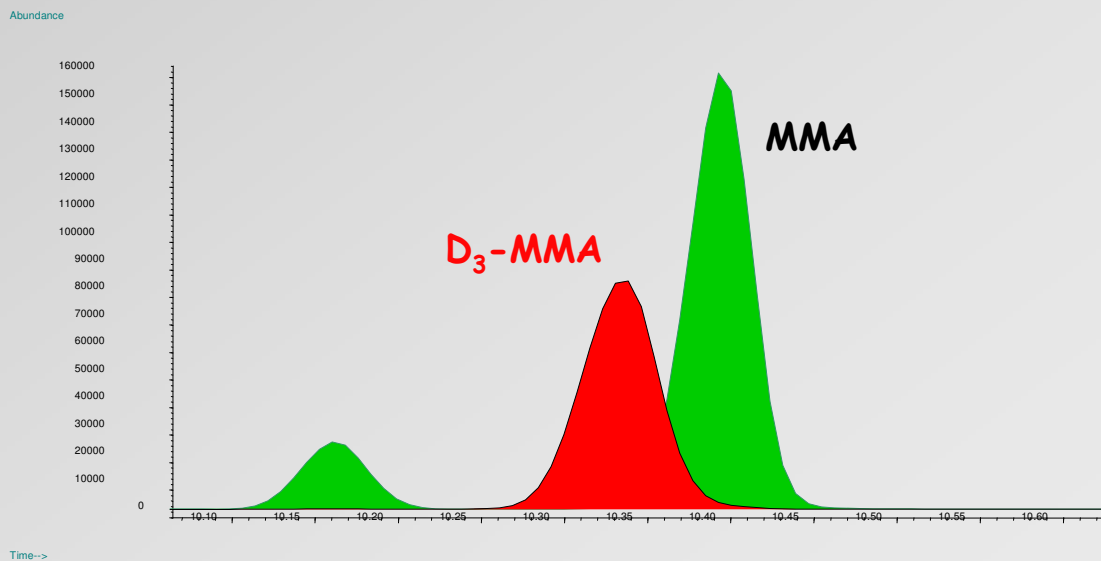
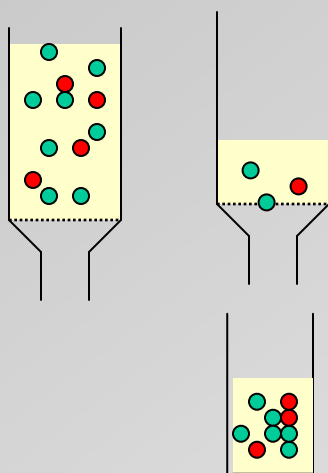
Methylmalonic acid TMS-ester

MW = 262



D₃-Methylmalonic acid TMS-ester

MW = 265



2006

Malattie metaboliche a esordio acuto

Aminoacidopatie

- difetti del ciclo dell' urea
- MSUD
- Tirosinemia tipo I

Acidosi organiche

- PCCD, MMA
- IVA, MCD, 3HMGCoA, Cbl def., GA I

Difetti di β -ossidazione

Acidosi lattiche

- Dif. Catena respiratoria, PC
- Dif F-1,6 difosfatasi

M. perossisomiali



Difetti del ciclo dell'urea

Starting point:

quadro clinico

iperammonemia

coinvolgimento epatico

no acidosi metabolica

• metaboliti specifici :

Gln, Cit, Asa, Arg (Orn, Lys) plasma

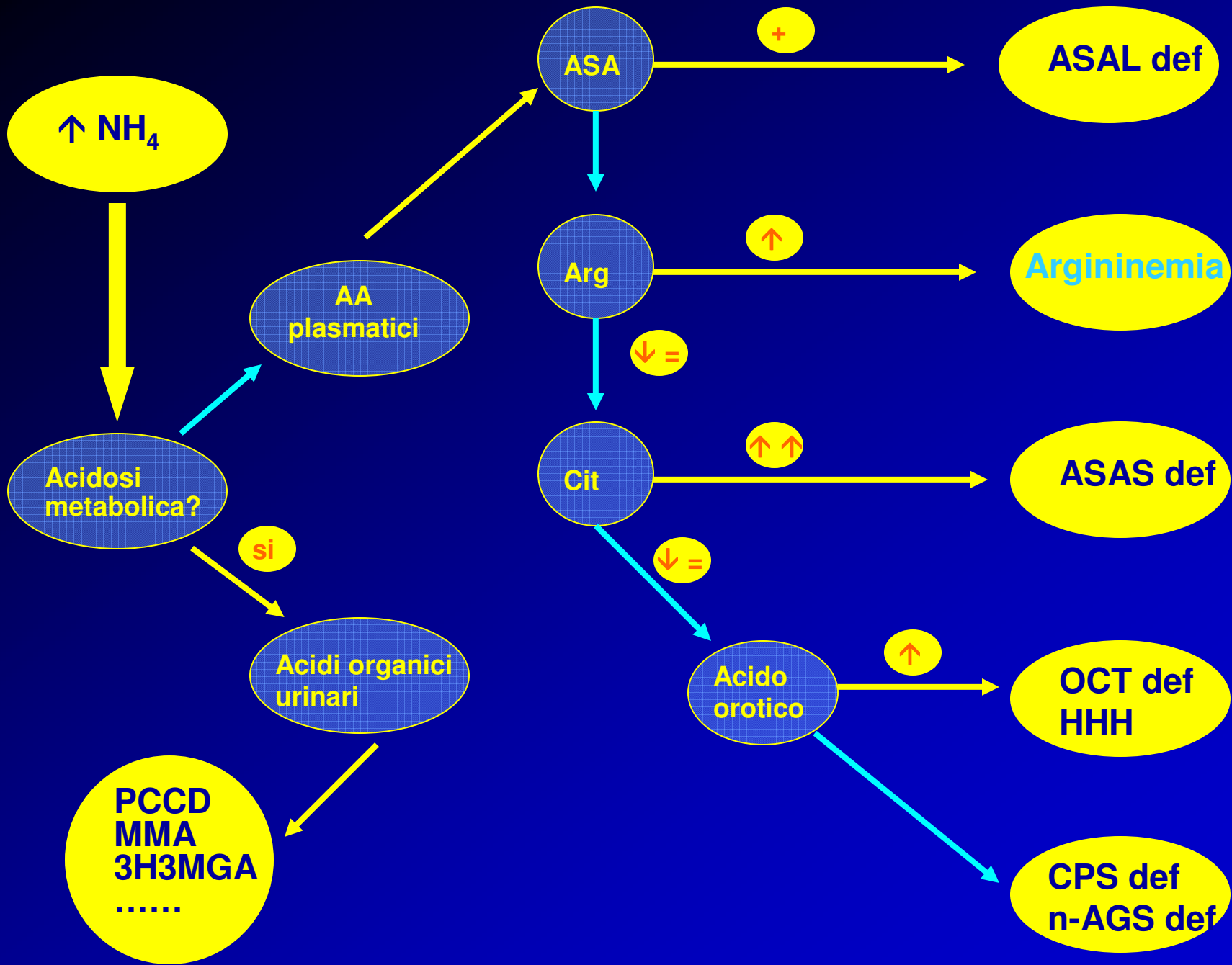
(analizzatore di aminoacidi - IEC)

• metaboliti secondari :

acido orotico urine

(HPLC, GC-MS, MS-MS)





MSUD

Starting point:

quadro clinico

acidosi metabolica

• metaboliti specifici :

Val, Ile, Leu, Aile plasma

(analizzatore di aminoacidi - MS-MS)

BCKA urine

(GC-MS)



PCCD - MMA

Starting point:

Quadro clinico

acidosi metabolica

iperammonemia

(chetonuria)

•metaboliti specifici :

acido propionico (sangue)

acido metilmalonico (urine - sangue)

(GC-MS, HPLC)

•metaboliti secondari :

acido lattico, 3-OH propionico, metilcitrico, chetoni, acil-gly,

acil-carnitine, altri acidi organici

(GC-MS, MS-MS)



difetti di β - ossidazione

Starting point:

quadro clinico

ipoglicemia

coinvolgimento epatico / muscolare

(acidosi metabolica)

(sindrome Reye-like)

- metaboliti (secondari) diagnostici :

acil-carnitine (MS-MS)

acidi dicarbossilici (GC-MS)

carnitina libera (enzimatico, MS-MS)

FFA (GC-MS)

- altri metaboliti:

chetoni (\downarrow)

(acido lattico)

...



Difetto di Fruttosio 1,6 difosfatasi

Starting point:

quadro clinico

ipoglicemia

acidosi metabolica

chetonuria

- metaboliti (secondari) diagnostici :

glicerolo

sn-glicerol-3-P

(GC-MS)

- altri metaboliti:

acido lattico, chetoni



Difetti perissosomiali

Starting point:

**quadro clinico (coinvolgimento snc)
coinvolgimento epatico**

- metaboliti specifici :

VLCFA

acido fitanico e pristanico

plasmalogeni eritrocitari

acido pipecolico

acidi biliari

(GC-MS , MS-MS)



VLCFA

pristanic

phytanic

plasmalogens

on fresh RBC

on plasma
in
one
analysis

— normal
— abnormal

High pri/phy

**Refsum
disease**

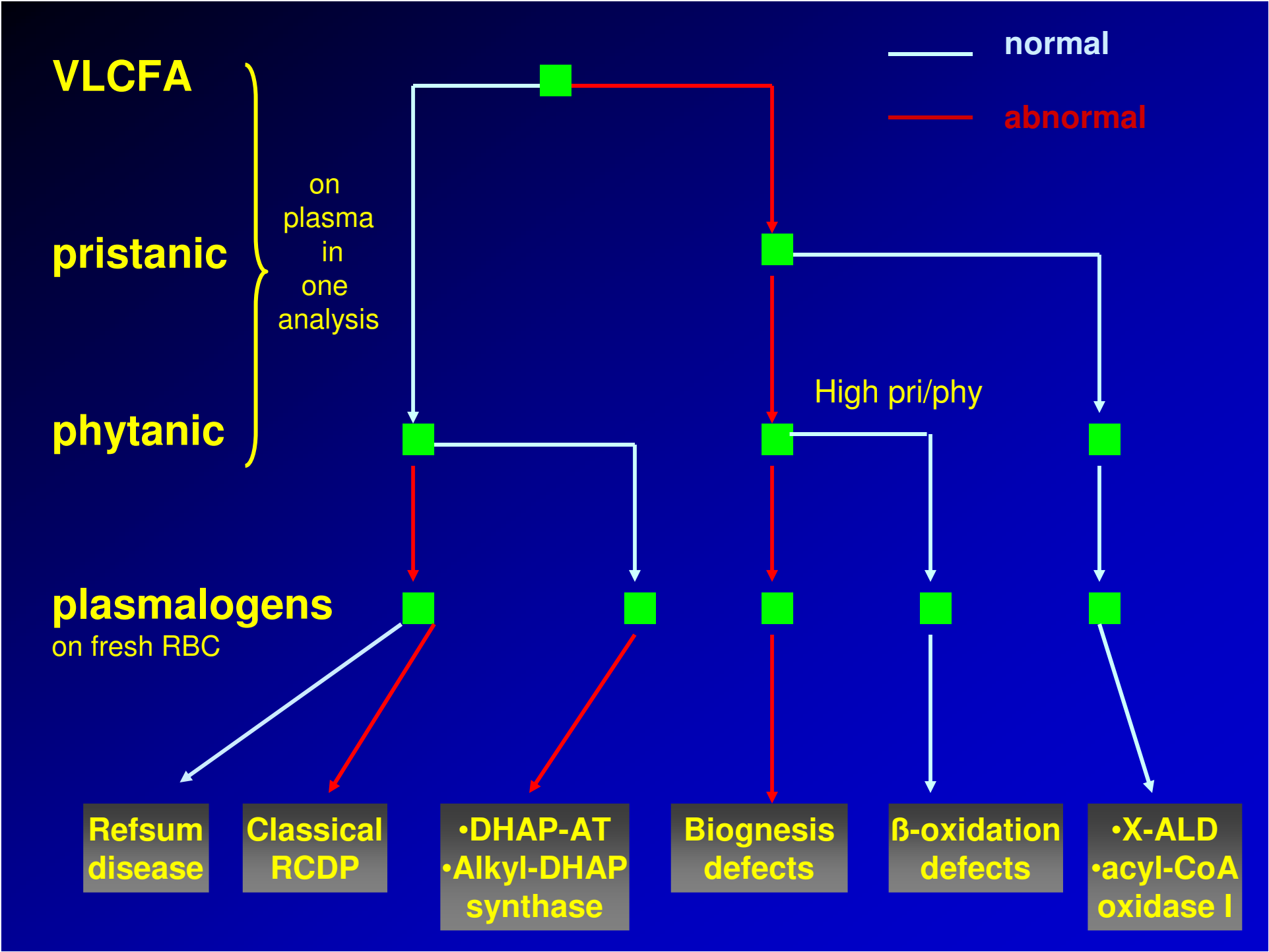
**Classical
RCDP**

**•DHAP-AT
•Alkyl-DHAP
synthase**

**Biogenesis
defects**

**β-oxidation
defects**

**•X-ALD
•acyl-CoA
oxidase I**



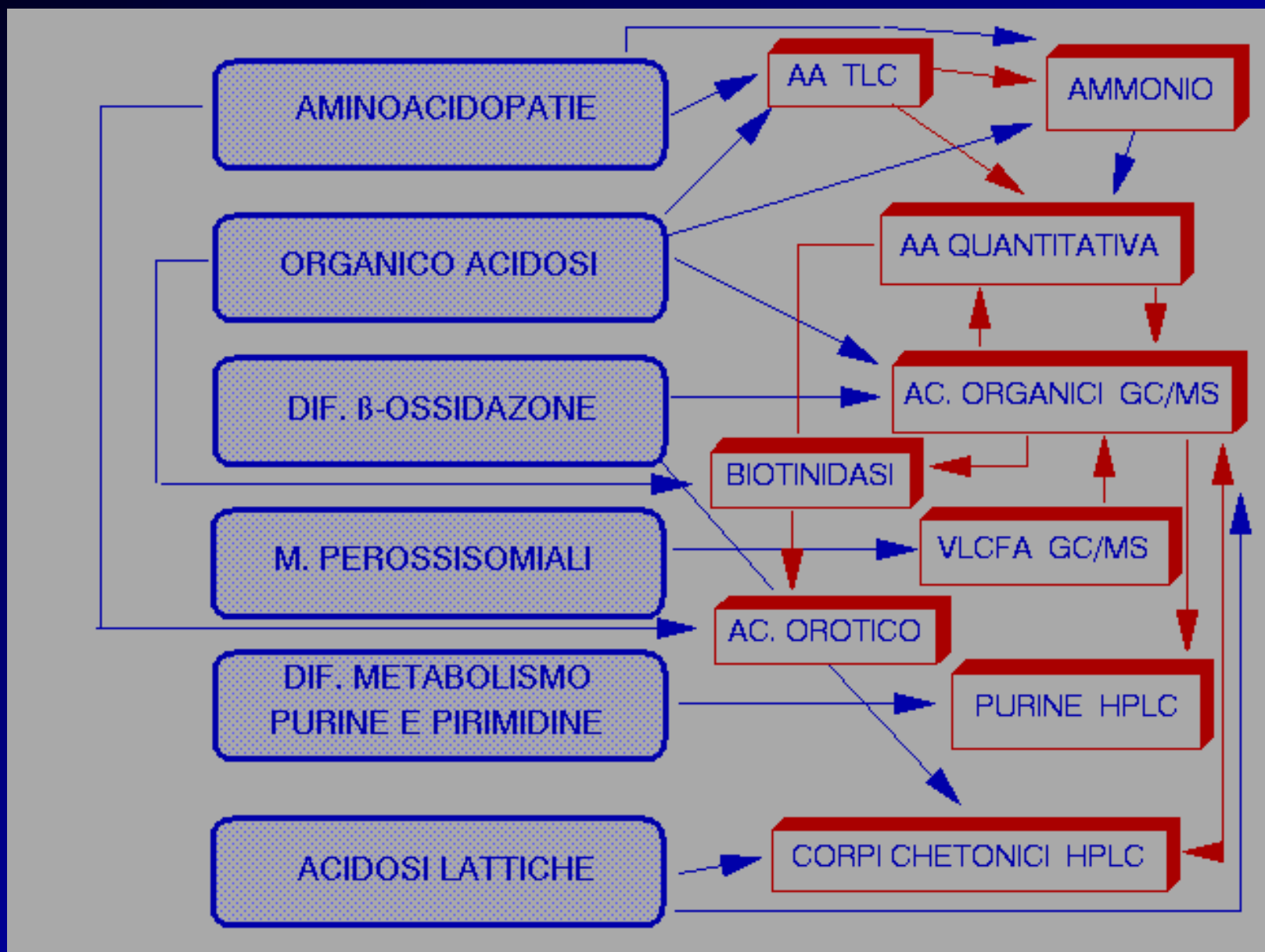
Starting point:
quadro clinico

...

Nell'era dello screening esteso ...

Starting point:

alterazioni biochimiche (a livello di metaboliti) allo screening neonatale in un soggetto “*virtualmente asintomatico*”



Messaggio (provocatorio) finale:

E' sempre sufficiente eseguire (solo) l'esame che ci è stato richiesto?

A volte NO



Siamo noi gli specialisti ?

Solo se siamo dei professionisti !