

Biologie & Qualité  
Paris 27 novembre 2012

**Chromatographie des Acides aminés**

# Pré-analytique

- Renseignements cliniques, diététiques et thérapeutiques : indispensables à l'interprétation
- Le dosage d'acides aminés isolés n'est pas recommandé, sauf cas particuliers (notamment, homocystéine totale plasmatique ; cystine urinaire dans le suivi des cystinuries)
- Le dosage des acides aminés urinaires doit s'accompagner systématiquement d'un dosage des acides aminés plasmatiques
- Le dosage des acides aminés du LCR doit s'accompagner systématiquement d'un dosage des acides aminés plasmatiques

Ces non-conformités non critiques sont à signaler par courrier systématiquement, avant ou avec le rendu des résultats

# Pré-analytique

- **Plasma**

- **Préparation du patient** : jeûne physiologique en fonction de l'âge. Chez le nourrisson, avant le biberon. Chez le grand enfant et l'adulte, minimum de 6 heures.
- **Anticoagulant** : héparinate de lithium
- **Volume minimum de plasma** : 150-200  $\mu$ L, mais technique dépendant
- **Délai maximum** avant centrifugation du sang : 3 heures
- **Stabilité du plasma avant déprotéinisation**
  - » - 80°C : au moins 1 an
  - » - 20°C : < 1 semaine pour les soufrés, autrement cf. déprotéinisé
  - » + 4°C : 6 heures
  - » 20-25°C : 30 minutes
- **Stabilité du plasma après déprotéinisation +/- neutralisation**
  - » - 80°C : au moins 2 ans
  - » - 20°C : 6 mois (au delà : somme glutamine + glutamate)
  - » + 4°C : 24 heures
  - » 20-25°C : 5 heures

- **Références** : Parvy, Bardet, Gasquet, Rabier, Kamoun 1995 Clin Chem 41; de Jonge & Breuer 1996 Journal of Chromatography B, 677; Davis et al. 2009, BMC Clin Pathol 9.

# Pré-analytique

- Urines

- **Préparation du patient** : première miction du matin ou, à défaut, une miction au hasard
- **Contenant** : plastique sans conservateur
- **Volume minimum** : 150-200  $\mu\text{L}$ , mais technique dépendant
- **Bandelette urinaire** : au minimum pH, corps cétoniques, nitrites
- **Interférences**
  - » Contamination bactérienne (test nitrites positif) : élévation proline, glycine
  - » Contamination par selles : élévation proline, acide glutamique, acides aminés ramifiés
  - » Présence de leucocytes : élévation taurine
  - » Présence d'érythrocytes : diminution arginine (convertie en ornithine)
  - » Protéinurie : diminution cystine et homocystine
- **Stabilité**
  - » - 20°C : au moins 2 semaines
  - » + 4°C : 24h (toujours à +4°C après recueil des mictions)

Référence:

**Bremer HJ, Duran M, Kamerling JP, et al, eds. Disturbances of Amino Acid Metabolism: Clinical Chemistry and Diagnosis. Baltimore-Munich: Urban and Schwarzenberg; 1981:80-82.**

Biologie & Qualité - Mise à jour octobre 2013

# Pré-analytique

- **LCR**

- **Préparation du patient** : prélèvement pour chromatographie des acides aminés plasmatiques simultanément (délai maximum entre les deux : 2 heures)
- **Contenant** : tube sec sans conservateur
- **Volume minimum** : 150-300 µL, mais technique dépendant
- **Délai** maximum avant centrifugation du LCR : 3 heures
- **Recommandation** : congélation à -20°C ou -80°C le plus rapidement possible après centrifugation
- **Conservation** après déprotéinisation +/- neutralisation
  - » - 80°C : au moins 2 ans
  - » - 20°C : 6 mois (au delà : somme glutamine + glutamate)
  - » + 4°C : 24 heures
  - » 20-25°C : 5 heures

- *Références:*

- **Goldsmith R.F. et al**, *Clin Chem* 33/10, 1736-1740, 1987
- **Scholl-Bürgi S. et al** *Pediatrics* 121, n°4, e920-e926, 2008
- **Anesi A et al**, *Clin Chem* 44,N°11,1998

# Processus analytique : méthodes

- Échange d'ions avec détection ninhydrine: Jéol, Hitachi, Biochrom, ...  
Durée analyse : 90 min - 120 min
  
- LC-MS/MS
  - Méthode sans dérivation
  - Méthode avec dérivation (kit AB-Sciex aTRAQ®)Durée d'analyse : 20 min - 30 min
  
- HPLC : Séparation UPLC détection UV après dérivation (Waters, AccQ•Tag™ )  
Durée d'analyse : 40 min

# Processus analytique

- Acides aminés à impérativement savoir détecter et/ou quantifier (en plus des acides aminés standards)
  - **Indispensables au diagnostic d'une aminoacidopathie**
    - » Sulfocystéine
    - » Alloisoleucine
    - » Acide argininosuccinique
    - » Homocitrulline
    - » Iminodipeptides
  - **Outils complémentaires importants**
    - » Acide pipécolique
    - » Aspartylglucosamine
    - » Disulfure cystéine-homocystéine
  - **Permettant de conforter un diagnostic**
    - » Sarcosine +/- diméthylglycine
    - » Beta-alanine et BAIBA
    - » Acide formiminoglutamique (FIGLU)
    - » Acide delta-aminolevulinique
    - » Acide alpha-aminoadipique

# Processus analytique : étalonnage

- Nature des étalons : Wako, Sigma, Chromsystems (buvards) et Precision Instruments marqué CE.
- Mode d'étalonnage
  - IEC : étalonnage externe
  - MS/MS : sans dérivation : nécessité d'utiliser des isotopes stables des principaux acides aminés
  - MS/MS kit ABSciex
    - Étalonnage interne : étalon titré pour chaque acide aminé
    - Contrôle des temps de rétention par échantillon SST ABSciex®
- Fréquence des étalonnages
  - IEC : à chaque changement du réactif ninhydrine ou hebdomadaire
  - MS/MS : à chaque série



# Étalonnage : recommandations

- IEC, HPLC : étalonnage externe avec les acides aminés correspondants
- LC-MS/MS : étalons internes, marquage par isotopes stables  
(Kit AB Sciex ou produits individuels)
- Attention : l'étalonnage d'une molécule avec une autre molécule même proche chimiquement (marquée ou non) est à justifier

# Processus analytique

- Contrôles de qualité
  - **CIQ**
    - » SKML, Précision Instrument, contrôle ABsciex 45AA, contrôles maison, Chromsystems (sang sur buvard)
    - » Périodicité recommandée
      - IEC : minimum 1 fois par mois ou à chaque changement de colonne analytique
      - LC-MS/MS : dans chaque série
  - **EEQ** : ERNDIM quantitative amino acids in plasma (fréquence 8/an)

# Dossier validation / vérification de méthodes

## Portée B

- Dossier COFRAC (voir Formulaire SH FORM 43)
- Étalonnage
  - Precision Instrument : marqué CE
  - Wako, Sigma, standards maison : non marqués CE
- Fidélité
  - Répétabilité : analyser 8 préparations du même CIQ dans la même série
  - Fidélité intermédiaire : analyser 10 préparations du même CIQ dans 8 séries différentes
- Validation nécessaire pour toutes les méthodes

# Vérification des intervalles de référence

- **Détermination des intervalles de référence** : en fonction de la méthode et des données de la littérature
- **Comparaison entre populations** : Vérification de l'intervalle de référence à partir d'un échantillon de 20 sujets apparemment sains : acceptation des intervalles de références si le nombre de résultats en dehors des limites est inférieur ou égal à 2

*Référence : Ann Biol Clin 2010 ; 68 (Hors série no 1) : 305-313 / NF EN ISO 15189 SFBC « Accréditation des laboratoires de biologie médicale » / SG2-09*

# Post-analytique

## Interprétation

- Tout résultat doit être accompagné d'un commentaire par un biologiste habilité
- Voir la liste des commentaires recommandés hors interprétation diagnostique
- Indiquer les intervalles de référence

### *Références des articles avec valeurs usuelles*

- *Lepage et al., Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population, 1997, Clin Chem 43*
- *LABORATORY GUIDE TO THE METHODS IN BIOCHEMICAL GENETICS, SPRINGER 2008*
- *Jones et al., 2006, "Reference data for cerebrospinal fluid and the utility of amino acid measurement for the diagnosis of inborn errors of metabolism", Ann Clin Biochem. 2006;43*

# Post-analytique

## **Délai maximum de rendu de résultats**

- Urgence motivée par un métabolicien senior : 12 - 48 heures
- Hors urgence : plasma 10 jours, urines 20 jours

## **Conservation des échantillons après analyse pour vérification des résultats**

- Plasma congelé à -20°C : < 1 semaine pour les acides aminés soufrés
- Plasma déprotéinisé : délai de rendu des résultats de l'analyse

**Conservation des données brutes et des doubles de résultats** : cf GBEA (arrêté du 26 novembre 1999)

# Valeurs d'alerte

- Potentiellement toute valeur sortant de l'intervalle de référence
- Logique des variations des acides aminés les uns par rapport aux autres = interprétation globale d'un profil !
- **Interprétation**
  - 1) Profil suggestif d'une maladie métabolique héréditaire  
Communiquer les résultats, tracer sur le compte-rendu de résultat
  - 2) Évoquer d'éventuelles conditions pré-analytiques non-respectées
  - 3) Discuter l'effet d'un traitement, des conditions nutritionnelles
  - 4) Suggérer un contrôle à distance, si toujours pas de diagnostic
  - 5) Signaler un profil atypique et recommander que l'on contacte un Centre de Référence

# Post-Analytique

**Tout résultat doit être accompagné d'un commentaire rédigé par un biologiste habilité**  
**Proposition d'une liste de commentaires hors interprétation diagnostique**

## **Exemples**

### **Plasma**

- Le profil chromatographique de l'échantillon analysé ne montre pas d'anomalie évocatrice d'une aminoacidopathie.
- Aucune interprétation ne peut être formulée en l'absence de renseignements cliniques, thérapeutiques et diététiques.

### **Urines**

- Résultats à interpréter en tenant compte d'une créatinine urinaire anormalement basse pour l'âge (miction au hasard ?). Si le contexte clinique le justifie, il est souhaitable de contrôler ces résultats sur une première miction du matin.
- Chromatographie des acides aminés urinaires normale ce qui n'exclut pas une aminoacidopathie. Une chromatographie des acides aminés plasmatiques serait plus informative.

### **LCR**

- Hyperaminoacidorachie non spécifique : ponction lombaire traumatique, méningite, ... ?