

Acides organiques urinaires

Biologie & Qualité, Paris 27 novembre 2012

Mise à jour octobre 2013

Validation de méthode

Profil des acides organiques urinaires
= interprétation globale d'un profil
avec quelques éléments quantifiés

- ▶ Acides organiques quantifiés : validation selon SH form 43
- ▶ Profil des acides organiques sans données quantitatives dans le résultat : validation selon SH form 44

Pré-analytique

- ▶ Renseignements cliniques, diététiques et thérapeutiques (formulaire commun proposé)
- ▶ Le dosage d'un acide organique isolé n'est pas recommandé, sauf cas particuliers (suivi d'acidurie organique, acide homogentisique, acide orotique, ...)
- ▶ Prélèvement : urines (plasma, LCR, si prélèvement urines impossible)
 - ▶ 1^{ère} miction du matin
 - ▶ Urine en crise
 - ▶ Noter l'heure de prélèvement
- ▶ Contenant : plastique sans conservateur
- ▶ Volume minimum
 - ▶ Acides organiques urinaires : 1 mL
 - ▶ Dosage de créatinine : volume dépendant de la technique utilisée

Pré-analytique

- ▶ **Conservation**
 - ▶ 20 -25°C : 6 heures
 - ▶ +4°C : 24 heures
 - ▶ -20°C et -80°C : plusieurs mois
- ▶ **Acheminement**
 - ▶ Le plus rapidement possible
 - ▶ Si > 6 heures, congeler et acheminer congelé
- ▶ **Bandelette urinaire : au minimum**
 - ▶ pH
 - ▶ Nitrites
 - ▶ Corps cétoniques

Processus analytique : recommandations

Processus analytique : généralités

- ▶ Prise d'essai : **1 μmol de créatinine**
 - ▶ Minimum 200 μL , maximum 1 mL
 - ▶ Compléter à 1 mL avec NaCl isotonique si volume < 1 mL
- ▶ Tubes utilisés (extraction et évaporation) : **tubes jetables** à vis avec bouchons
- ▶ Méthode : **GC/MS**
- ▶ Étalons internes : **minimum 2**
 - ▶ Un en début de chromatographie : exemple 4-phénylbutyrate
 - ▶ Un en fin de chromatographie : exemple heptadécanoate (C_{17})
- ▶ Traitement des urines par uréase : facultatif
- ▶ Oxymation : fortement recommandée quand suspicion
 - ▶ Tyrosinémie type I : hydroxylamine
 - ▶ Leucinose intermittente : hydroxylamine ou quinoxalinol

Processus analytique : extraction, évaporation

- ▶ Acidification des urines
- ▶ Ajout sel : à saturation
- ▶ Solvant
 - ▶ Acétate d'éthyle
 - ▶ Volume : 2 volumes d'urines
- ▶ Agitation
 - ▶ Agitateur automatique
 - ▶ Minimum 2 min
- ▶ Centrifugation
- ▶ Nombre extractions : 3 (5 pour l'acide glycérique)
- ▶ Évaporation
 - ▶ < 40°C
 - ▶ Speedvac ou azote

Processus analytique : dérivation, injection

▶ Dérivation

- ▶ Attention à l'humidité
- ▶ Réactif : **BSTFA TMCS** +/- pyridine, chloroforme ou acétonitrile
- ▶ Volume final : 100 µL
- ▶ Incubation : 45 min à 80°C à sec
- ▶ Dilution : dichlorométhane / hexane (2/1; V/V) ou acétate d'éthyle si nécessaire

▶ Injection

- ▶ Mode : en cohérence avec le matériel utilisé
- ▶ Température : en cohérence avec le solvant utilisé

Processus analytique : étalonnage

- ▶ Minimum une fois par an, minimum 3 concentrations
- ▶ Passer un point de gamme à chaque changement de colonne et/ou à chaque nettoyage de source
- ▶ Solutions mères d'étalons, préparées par pesée en solution dans du NaCL isotonique, conservées à -20°C
- ▶ Matrice : urine témoin adulte (200 µL) surchargée (qsp 1 mL) par des solutions étalons filles
- ▶ Nécessité d'obtenir des solutions étalons marquées CE : contact pris auprès des industriels

Composés à quantifier systématiquement

- ▶ Lactique
- ▶ Glycolique
- ▶ 3-hydroxybutyrique
- ▶ 3-hydroxypropionique *
- ▶ 3-hydroxyisovalérique
- ▶ Méthylmalonique
- ▶ Ethylmalonique
- ▶ Fumarique
- ▶ Glutarique
- ▶ Adipique
- ▶ 2-hydroxyglutarique
- ▶ Subérique
- ▶ Sébacique

* Quantification avec l'acide lactique comme étalon

Composés à savoir quantifier si besoin

- ▶ Malonique
- ▶ 4-hydroxybutyrique
- ▶ Méthylsuccinique
- ▶ Glycérique
- ▶ 3-méthylglutarique
- ▶ 3-méthylglutaconique
- ▶ Malique
- ▶ Pyroglutamique
- ▶ 3-hydroxyglutarique
- ▶ 3-hydroxy-3-méthylglutarique
- ▶ 2-cétoglutarique
- ▶ N-acétylaspartique
- ▶ Méthylcitrique
- ▶ Homogentisique
- ▶ Mévalonique
- ▶ Propionylglycine
- ▶ Butyrylglycine
- ▶ 2-méthylbutyrylglycine
- ▶ Isovalérylglycine
- ▶ 3-méthylcrotonylglycine
- ▶ Tiglylglycine
- ▶ Hexanoylglycine
- ▶ Subérylglycine

Traçabilité

- ▶ Suivi de la surface des étalons internes : évaluation de la propreté du système
- ▶ Identification des personnes ayant réalisé
 - ▶ Extraction
 - ▶ Injection
 - ▶ Lecture
- ▶ **Maintenances**
 - ▶ Calendrier
 - ▶ Personne

Contrôles

- ▶ Évaluation de la variabilité de la surface des étalons internes
- ▶ Contrôles de qualité internes (CQI)
 - ▶ ERNDIM (commercialisé par SKML) et éventuellement « maison »
 - ▶ A passer au moins une fois par mois
 - ▶ A passer à chaque changement de colonne
- ▶ Évaluations externes de la qualité (EEQ)
 - ▶ ERNDIM quantitative organic acids : **obligatoire si rendu de résultats quantitatifs**
 - ▶ ERNDIM qualitative organic acids : **obligatoire**

Post-analytique : lecture des profils

- ▶ Analyse en mode full scan
- ▶ Recherche automatique en bibliothèque
- ▶ Bibliothèques : **personnelle**, NIST, PMW_ToX, ...
- ▶ Composés à rechercher systématiquement

Composés	Ions spécifiques
4-hydroxybutyrique (si pas uréase)	204 ; 233
Octanoïque (si pas uréase)	201
Mévalonolactone	115 ; 187
2-hydroxy / 3-hydroxyglutarique	129 / 185 ; 259
Orotique	254 ; 357
Acylglycines	104 ; 158 ; 172 ; 360
Vanillactique	209

Post-analytique : interprétation

▶ Résultat quantitatif

- ▶ Possible pour un composé appartenant à l'EEQ : étalonnage externe avec le composé commercialement disponible
- ▶ Suivis thérapeutiques : méthodes spécifiques, préférentiellement par dilution isotopique (ex : AMM, méthylcitrate, ...)
- ▶ Intervalles de référence : Boulat et al, 2003, Clin Chem Lab Med, 41(12): 1642-1658, établis sur une population pédiatrique témoin avec une méthode identique

Post-analytique : seuils d'alerte

Acide organique	Seuil d'alerte (mmol/mol creat)	Seuil d'alerte particulier (mmol/mol creat)	Remarques
Lactique	> 150	Nné – 1 mois > 300	Cf intermédiaires du cycle de Krebs
3-hydroxyisovalérique	> 50		Sauf cétose, valproate Rechercher tiglyl- et 3-méthylcrotonylglycine
Méthylmalonique	> 10	Nné – 6 mois > 20	Demande de contrôle
Ethylmalonique	> 10	Nné – 1 an > 15	Sauf cétose, valproate, TCM

Post-analytique : seuils d'alerte

Acide organique	Seuil d'alerte (mmol/mol creat)	Seuil d'alerte particulier (mmol/mol creat)	Remarques
Méthylsuccinique	> 15		Voir élévation EMA et rechercher butyrylglycine
Fumarique	> 10	Nné – 1 mois > 30	Rechercher élévation du malique
Glutarique	> 10		Sauf cétose, valproate, TCM
Adipique	>10	Nné – 1 an > 30	Sauf cétose, valproate, TCM A interpréter avec subérique et sébacique

Post-analytique : seuils d'alerte

Acide organique	Seuil d'alerte (mmol/mol creat)	Seuil d'alerte particulier (mmol/mol creat)	Remarques
Pyroglutamique	> 200		Voir si traitement paracétamol, perfusion d'acides aminés, dénutrition, alcoolisme Rechercher élévation uracile et orotique
Tiglylglycine	> 10		
2-hydroxyglutarique	> 25	Nné – 1 an > 50	

Post-analytique : seuils d'alerte

Acide organique	Seuil d'alerte (mmol/mol creat)	Seuil d'alerte particulier (mmol/mol creat)	Remarques
3-hydroxy-3-méthylglutarique	> 30	Nné – 1 mois > 150	
Subérique	> 5	Nné – 1 an > 20	
Sébacique	> 5	Nné – 1 an > 15	

Post-analytique : interprétation

- ▶ Le profil doit être interprété dans sa globalité, avec éventuellement quelques données quantitatives
- ▶ Tout résultat doit être accompagné d'un commentaire rédigé par un biologiste habilité
- ▶ Seule la quantification des acides organiques appartenant à l'EEQ peut être rendue
- ▶ Proposition d'une liste de commentaires hors interprétation diagnostique

Exemples

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

Post-analytique

- ▶ Délai maximum de rendu de résultats
 - ▶ Urgence motivée par un métabolicien senior : 12 - 48 heures
 - ▶ Hors urgence : 30 jours
- ▶ Conservation des échantillons après analyse : 1 mois après rendu de l'analyse
- ▶ Conservation des données brutes et des doubles de résultats : cf GBEA (arrêté du 26 novembre 1999)

Validation de méthode (1)

Critères de performance	Échantillons utilisés	Nombre d'extractions	Injection	Interprétation
Répétabilité	2 niveaux de concentration	8 (même technicien, même jour)	dans le même run	Calcul du CV
Fidélité intermédiaire (FI)	2 niveaux de concentration	1 fois par semaine, 8 semaines	le jour de l'extraction	Calcul du CV
Justesse	A partir de données de FI	/	/	Calcul du biais

Validation de méthode (2)

Critères de performance	Echantillons utilisés	Nombre d'extractions	Injection	Interprétation
Contamination inter échantillons	EEQ concentrations élevées (H)	1	3 successives (H1, H2, H3)	Calcul de la contamination: $(B1-B3)/(mH-B3) \times 100$
	EEQ concentrations basses (B)	1	3 successives (B1, B2, B3)	

Validation de méthode (3)

Critères de performance	Echantillon utilisé	Nombre d'extractions	Injection	Interprétation
Limite de détection	NaCL	8 (même technicien, même jour)	dans le même run	3 x Sb (écart type)
Limite de quantification	NaCL	8 (même technicien, même jour)	dans le même run	10 x Sb (écart type)
Limite supérieure de linéarité	/	/	/	cf gamme d'étalonnage
Stabilité des réactifs	A étudier si < 1 500 analyses / an			