

ACYLCARNITINES

Journée Biologie et Qualité
27 novembre 2012 – Paris
Mise à jour octobre 2013

Préambule

- **Validation quantitative impossible**
 - Pas d'EEQ
 - Pas de solutions étalons d'acylcarnitines commercialisées
 - Diversité des données quantitatives en fonction des étalons internes utilisés
 - Etude pilote européenne acylcarnitines plasmatiques menée par Madrid
 - Etude inter-laboratoire acylcarnitines sur taches de sang : Lille, Lyon, Nancy, Paris
- **Proposition de le considérer comme un acte innovant**
 - Non soumis dans l'immédiat à l'accréditation des laboratoires
 - Contact auprès des industriels : solutions étalons

ACYLCARNITINES

-

ETAPE PRÉ-ANALYTIQUE

Pré-analytique

- **Préparation du patient**
 - Prélèvement dans la mesure du possible en période aiguë (de décompensation)
 - A jeun
 - > 14 heures chez l'adulte
 - Avant biberon chez le nouveau-né
- **Nature de l'échantillon**
 - Sang séché sur papier buvard
 - Sang prélevé sur héparinate de Li ou Na
 - Urines (sans conservateur)
 - Liquide amniotique
- Toute feuille de demande doit être accompagnée d'un formulaire de renseignements cliniques, diététiques et thérapeutiques
 - indispensables à l'interprétation (hypoglycémie, cardiomyopathie, coma, mort subite dans la fratrie, consanguinité, rhabdomyolyse, intolérance à l'effort, insuffisance hépatique...)
 - *Formulaire proposé*
 - ➔ Dans l'idéal, combiner acylcarnitines plasmatiques & CAO urinaires

Nature de l'échantillon (1)

- **Plasma**
 - volume minimum : 500 µL de sang hépariné, 200 µL plasma
 - anticoagulant : héparine (éviter l'EDTA)
 - délai d'acheminement et centrifugation : sur site < 3 heures, température ambiante. Si envoi extérieur : plasma congelé. Indication de l'heure de prélèvement indispensable
 - Stabilité dans le plasma à -20°C : les plasmas ne doivent pas être conservés plus d'un an
- **Sang séché sur buvard**
 - sang prélevé par lancette ou sang veineux sur héparine, déposé immédiatement (<2 minutes) sur papier buvard, laisser sécher à température ambiante et à l'air libre
 - Transport du buvard sec à température ambiante dans une enveloppe papier
 - Conservation : à température ambiante, la demi-vie des AC à chaîne courte est d'environ 100 jours
- **Buvard vs plasma?**
 - Plasma quantitativement plus exact du fait de l'inexactitude du volume de sang contenu sur le buvard
 - Déficit en CPTI plus facile à identifier sur buvard et déficit en CPTII sur plasma ?
 - Comparaison en cours d'étude à Lille et Paris

Nature de l'échantillon (2)

- **Urines**
 - AC > C12 normalement non éliminées dans l'urine
 - **Intérêt limité**, réalisé à titre exceptionnel, en deuxième intention, après avoir réalisé un profil des acylcarnitines plasmatiques et un profil des acides organiques urinaires
 - Exception = acidurie glutarique de type I : patients faiblement excréteurs; l'acide glutarique peut être normal à la CAO urinaires et la glutarylcarnitine indétectable aux AC plasmatiques mais visible aux AC urinaires
 - Une miction de 2 ml minimum (1ère miction du matin ou urine en crise), à congeler dans un délai de 6 heures
- **Liquide amniotique**
 - Indications : aciduries organiques, déficit multiple en acyl-CoA deshydrogénases
 - Terme : > 16 semaines d'aménorrhée
 - Minimum 1 ml, à centrifuger, congeler le surnageant dans un délai de 6 heures
 - A coupler, dans la mesure du possible, au dosage de(s) acide(s) organique(s) correspondant(s)
- **Plasma / buvard post-mortem**
 - Difficulté d'interprétation : élévation des acylcarnitines à chaîne courte et moyenne liée à la cytolyse post-mortem + élévation de la carnitine libre
 - Possibilité de faux négatifs (nourrissons déplétés en carnitine). **Penser à récupérer le buvard de naissance**

ACYLCARNITINES
-
ETAPE ANALYTIQUE

Acylcarnitines à savoir impérativement identifier et/ou quantifier

- **Acylcarnitines à savoir quantifier si besoin :** C0*, C2*, C3*, C4*, C4OH, C5:1, C5*, C5OH, C6*, C8*, C10:1, C10*, C12:1, C12*, C3DC, C4DC, C5DC*, C14:1, C14*, C14:1OH, C14OH, C16*, C16:1OH, C16OH, C18:1, C18*, C18:1OH, C18OH, C16DC, C18:1DC, C18DC, C22, C24

() composé pour lequel il existe un isotope stable correspondant utilisé comme étalon interne*

- **Dans l'idéal**
 - avoir pour chaque composé un isotope stable de masse correspondante utilisé comme étalon interne
 - faire une identification qui repose sur le mode precursor ion scan et utiliser le mode MRM pour la quantification

Méthodologie : FIA-MS/MS état des lieux

	Équipement	Nature échantillon	Mode d'analyse	Dérivation	Etalonnage externe	Standards internes
Lille	Acquity/Quatro I XE Waters	Sang total buvard (plasma hépariné)	Precursor Ion (MRM pour C0)	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	Kit Chromsystems
Lyon	Agilent/Api 3200 ABSciex	Plasma hépariné	Precursor Ion + MRM	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	NSK-B Cambridge isotope
Nancy	Acquity/4000 Qtrap ABSciex	Plasma hépariné	Precursor Ion	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	Kit Chromsystems
Paris Necker	Api3000 ABSciex	Plasma hépariné	Precursor Ion + MRM	non	oui	NSK-B Cambridge isotope
Paris RDB	Api3000 ABSciex	Sang total buvard & plasma hépariné	Precursor Ion	Butylation	Non (quantif par rapport EI)	NSK-B Cambridge isotope

Dérivation ou non ?

- Pas de dérivation (NEM) ou dérivation par butylation (autres labos)
- Butylation : *a priori*, pas de problème de rendement de butylation puisqu'on normalise avec l'étalon interne qui subit le même traitement
- Concentration des étalons internes : Chromsystems plus adapté au buvard et Cambridge Isotope au plasma
- Importance de la durée de la dérivation (60°C, butanol HCl), idéal = 15 à 30 min
- Pour les techniques non dérivées, il est nécessaire d'utiliser des appareils plus sensibles
- Dans le cas d'une dérivation
 - le dosage de la carnitine libre devrait faire l'objet d'une analyse séparée
 - vérifier l'efficacité de la butylation : acétylcarnitine non butylée ($m/z = 204$) < 20% de C2 butylée ($m/z = 260$)
- Toujours faire un blanc pour détecter une éventuelle contamination

Etalonnage de la méthode

- Soit par des étalons internes titrés
 - Chromsystems
 - marqué CE pour le dépistage néonatal (réf 55004, 4 fois 50 ml)
 - composition : C0D9, C2D3, C3D3, C4D3, C5D9, C5DCD6, C6D3, C8D3, C10D3, C12D3, C14D3, C16D3, C18D3
 - stabilité affichée 3 semaines
 - Cambridge Isotopes (NSK-B)
 - non marqué CE
 - composition : C0D3, C2D3, C3D3, C4D3, C5D9, C8D3, C14D9, C16D3
 - stabilité 1 an à réception du réactif
- Soit par étalonnage externe avec présence d'étalons internes (Necker)
 - Solutions « maison » d'acylcarnitines non deutérées préparées au laboratoire
 - C0 (0-100 µmol/L)
 - C2, C3, C4, C5, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18 (0-10 µmol/L)
 - Problème de solubilisation des acylcarnitines à chaîne longue : à faire à chaud, dans l'éthanol
 - Fournisseur : Dr Herman J ten Brink (hj.tenbrink@vumc.nl) ou Sigma
(certificats d'analyse à conserver)

Validation

- Sang total sur papier buvard avec kit Chromsystems : kit marqué CE mais pour le dépistage, donc probablement portée A pour les analyses effectuées sur sang séché sur papier buvard
 - portée A (définition COFRAC)
- Plasma → portée B

Contrôles de Qualité

Type de contrôle	Nom	Périodicité
CIQ quantitatif (buvard)	Chromsystems Level I & Level II	Chaque série
CIQ quantitatif (plasma, urine)	SKML SAS et SAU (C0)	Chaque série
CIQ quantitatif (plasma, buvard)	Pools plasma ou sur buvard « maison », non surchargés & surchargés	Chaque série
EEQ quantitatif (plasma, urine)	ERNDIM SAS et SAU (C0)	8/an
EEQ qualitatif (buvard)	ERDNIM Qualitative Blood Spot Acylcarnitine Scheme	2x3/an
EEQ quantitatif (plasma, buvard)	Contrôles inter-laboratoires, étendus aux labo français intéressés	1/mois
EEQ quantitatif (buvard)	CDC Newborn Screening Quality Assurance Program	2/an

Critère d'acceptabilité de la série : $m \pm 2DS$

Fréquence CIQ : au moins un au début et un à la fin de la série

ACYLCARNITINES

-

ETAPE POST-ANALYTIQUE

Interprétation des résultats

- Tout résultat doit être accompagné d'un commentaire formulé par un biologiste habilité avec une étude systématique du profil au moment de la validation
- Variabilité possible des concentrations en acylcarnitines en fonction de l'état clinique et nutritionnel des patients. Si intime conviction, répéter plusieurs fois les profils et/ou réaliser l'étude génétique
- Criticité, causes d'erreur
 - Nature des tubes. Exemple : ne pas utiliser les tubes eppendorf standards : présence d'une interférence parasite à la même masse que l'octanoylcarnitine. Utiliser uniquement des tubes type Safe Lock
 - Centrifugation rapide et/ou hémolyse et/ou sang total congelé : élévation des acylcarnitines à chaîne longue avec un profil semblable aux profils sur buvard
 - Anticoagulant : éviter l'EDTA (extinction chimique, pics interférents +++)
 - Interférences médicamenteuses
 - Amoxicilline (Clamoxyl®) élévation C5 (dérivés butylés)
 - Céfotaxime (Claforan®) élévation C14:1, C16:1 OH (dérivés butylés)
 - Phenylbutyrate, benzoate : phenylacétylcarnitine & benzoylcarnitine (m/z 336 et 322, dérivés butylés)
 - Valproate (Dépakine®) : élévation C6, C8, C10, C8DC, déplétion en carnitine
 - Salicylate : salicylylcarnitine (m/z 338 dérivés butylés, m/z 282 non butylé)

Commentaires types

(hors interprétation diagnostique)

- Le profil de l'échantillon analysé ne montre pas d'anomalie évocatrice d'un déficit de l'oxydation mitochondriale des acides gras. Toutefois, si le prélèvement n'a pas été réalisé à jeun ou lors d'un épisode aigu, un profil normal ne permet pas d'exclure un déficit de l'oxydation mitochondriale des acides gras
- Profil des acylcarnitines sans d'anomalie évocatrice d'un déficit de l'oxydation mitochondriale des acides gras dans l'échantillon analysé. Cependant, la carnitine libre étant à la limite inférieure des valeurs usuelles, un contrôle du profil après supplémentation du patient en carnitine est souhaitable
- Aucune interprétation ne peut être formulée en l'absence de renseignements cliniques, thérapeutiques et diététiques
- Profil de cétose : élévation de l'acétylcarnitine, de la 3-hydroxybutyrylcarnitine et de certaines acylcarnitines à chaîne moyenne et à chaîne longue, saturées et insaturées
- Atteinte rénale probable : augmentation des acylcarnitines dicarboxylées
- Augmentation massive des acylcarnitines de toutes les longueurs de chaîne et de la carnitine libre évoquant un prélèvement effectué en période post-mortem

Seuils d'alerte & intervalles de référence

- A définir dans chaque labo en fonction de la méthode utilisée
- **Carnitine**
 - L'hypocarnitinémie est définie en fonction de l'âge (< 1mois ou > 1 mois)
 - Des valeurs inférieures aux seuils d'alerte doivent être systématiquement signalées au prescripteur
- **Profil des acylcarnitines** : toute anomalie caractéristique doit faire l'objet d'une communication rapide au prescripteur (tracée dans le compte-rendu) afin de mettre en place les mesures thérapeutiques adaptées

- Délai maximum de rendu de résultats

- Urgence motivée par un métabolicien senior : 12 - 48 heures
- Hors urgence : 15 jours

- Conservation des échantillons après analyse

- Recommandation = 1 mois après validation du compte-rendu de l'analyse

- Stabilité des acylcarnitines

- La stabilité des acylcarnitines dans le plasma congelé à -20°C serait de 12 à 18 mois. La stabilité des acylcarnitines à chaînes courtes serait moins bonne
- Une étude de la stabilité dans le plasma et le sang séché des acylcarnitines et de la carnitine est en cours
- Cas des buvards du dépistage néonatal (J3) : $+4^{\circ}\text{C}$ dans une boîte avec dessicant pendant 1 an minimum, selon recommandations AFDPHE

Conclusion

- Le profil des acylcarnitines est l'outil diagnostique des déficits de l'oxydation mitochondriale des acides gras
- Toutefois, il est essentiel
 - De récupérer le plasma/sang sur buvard durant un épisode aigu ou après un jeûne prolongé adapté à l'âge (au moins 14h chez l'adulte), sous surveillance clinique et en fonction du contexte clinique
 - Si le patient est en bonne condition clinique et/ou s'il n'est pas à jeun, un profil normal n'exclut pas une anomalie de l'oxydation mitochondriale des acides gras, et il ne faut pas hésiter à répéter plusieurs fois les analyses
 - De même, si le patient présente un déficit secondaire en carnitine, il est nécessaire de répéter le profil après supplémentation en carnitine
 - Penser qu'il est possible de retrouver le sang séché prélevé à la naissance (J3) dans le cadre du dépistage néonatal, après accord de la famille
- Il est indispensable que le biologiste dispose des renseignements cliniques, diététiques et thérapeutiques pour interpréter le profil