

PKU de la depistare la monitorizare

Biochimist Delia Corina

Chimist Toma Geanina

Chimist Cutieru Mihaela

Institutul National pentru Sanatatea Mamei si Copilului, Bucuresti

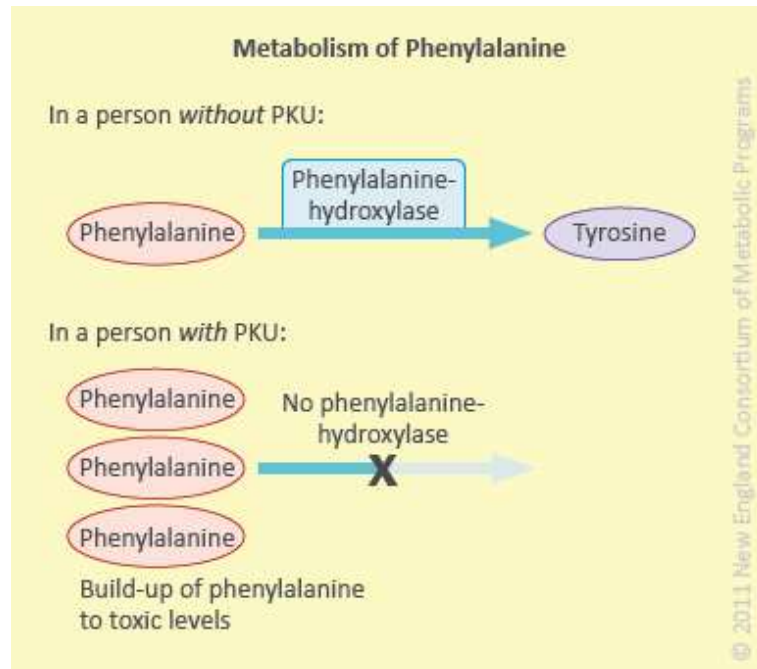
Masterand - Biochimist Cioara Nicoleta, Universitatea Bucuresti

Ce este fenilcetonuria?

Fenilcetonuria (PKU) este o eroare innascuta a metabolismului care duce la scaderea metabolismului aminoacizilor fenilalanina .

PKU netratată poate duce la dizabilități intelectuale, crize convulsive, probleme comportamentale și tulburări psihice.

De asemenea, poate avea ca rezultat un miros de specific si o piele sensibila.



Astfel convertirea fenilalaninei in **tirozina** nu poate avea loc, ducand la acumulari de Phenilalanina in sange.

Conversia Phe la Tyr are loc printr-un sistem de hidroxilare ce constă în:

- PAH;
- Cofactorul pterin neconjugat, tetrahidrobiopterina (BH4);
- enzime care servesc la regenerarea BH4 și anume dihidropteridin reductaza.

Mod de transmitere

Mod de transmitere - Autozomal recesiv.

Gene implicate si mutatiile aferente :

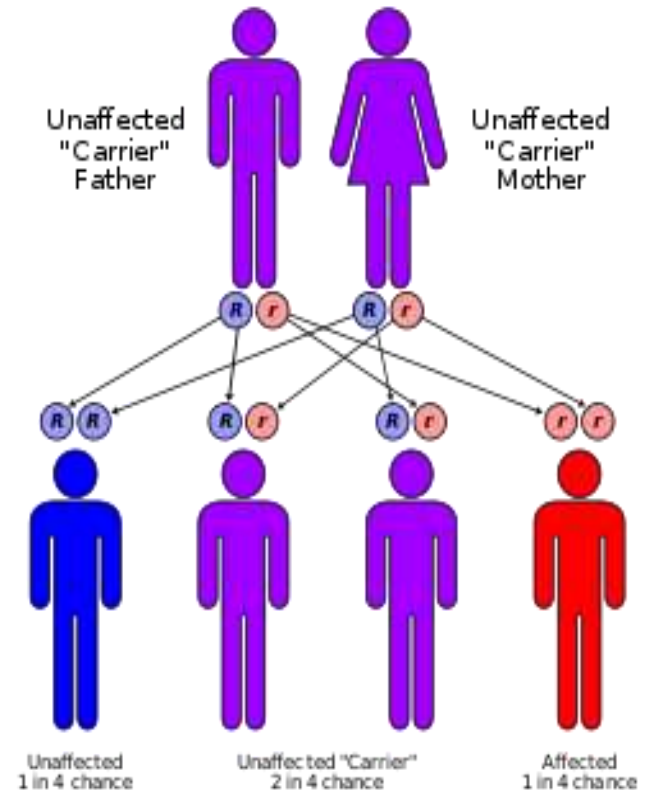
PAH -12q22-24.1,

GCH1 – 14q22.1-22.2,

PTS- 11q22.3-23.3,

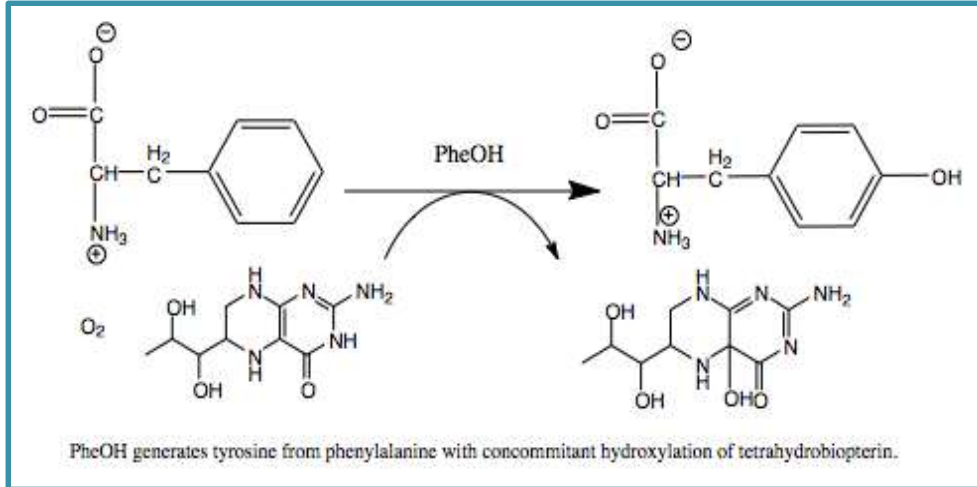
PCBD1 – 10q22

QDPR- 4p15.3



Afectiuni

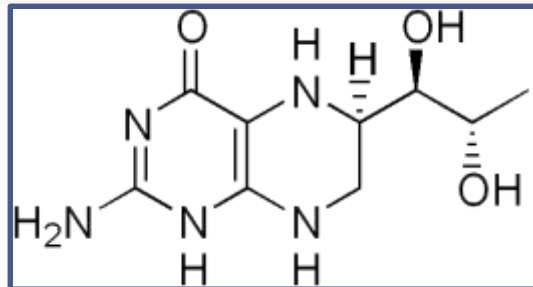
Classical PKU

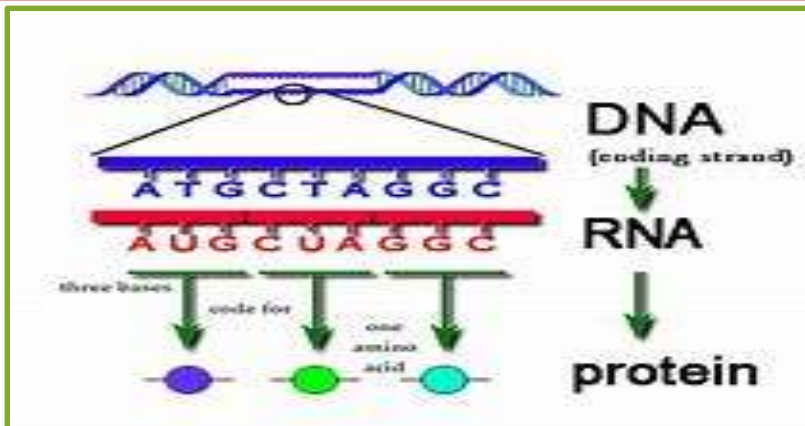
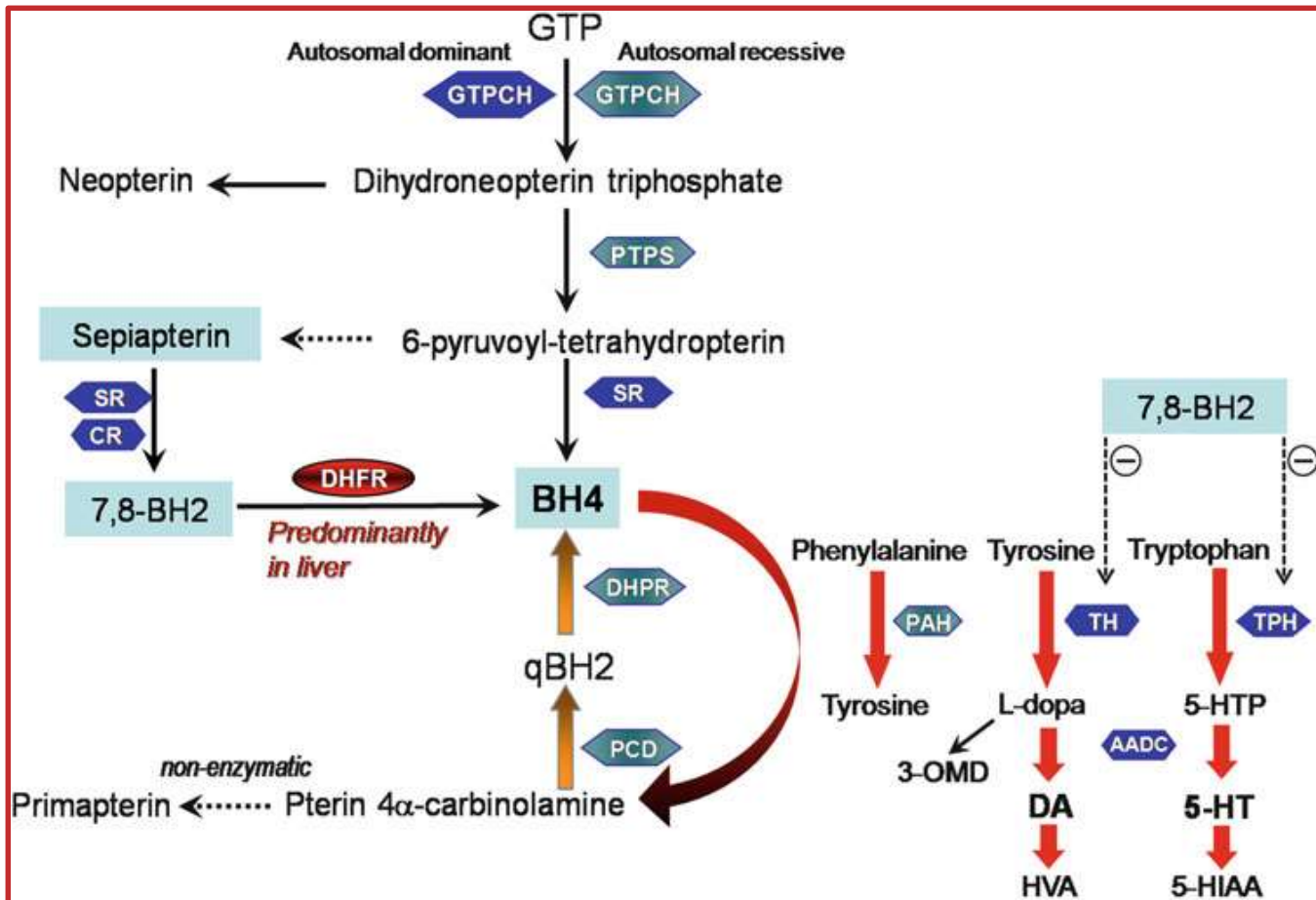


Clasica PKU si formele sale mai putin severe sunt cauzate de o gena mutantă pentru enzima fenilalanin hidroxilaza (PAH), care transforma aminoacidul fenilalanina (Phe) in tirozina.

Tetrahydrobiopterin - deficient hyperphenylalaninemia

Deficitul de tetrahydrobiopterină (THB, BH₄), este o tulburare metabolica rara care creste concentratiile plasmatiche ale fenilalaninei. Daca deficitul de tetrahydrobiopterina nu este tratat, fenilalanina se acumuleaza in organism,cauzand dizabilitati intelectuale.

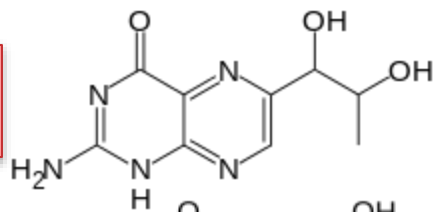




Diseases/ Alternativ name/ Abbreviation	Enzyme deficiency	Analyte/ biological sample (fluid or matrix) and characteristic changes							Other determinations	
		Phenylalani ne (P, U, CSF)	Biopterin (U, CSF, DBS)	Neopterin (U, CSF, DBS)	Dihydro- biopterine (CSF)	Phenylpiruvic acid (U)	5-Hydroxyindolacetic acid-5HIAA (CSF)	Homovanilic acid - HVA (CSF)	-	
Classic phenylketonu ria Classic PKU	Phenylalanine hydroxylase	↑↑↑			-	n-↑	↓-n (in infancy , not neonatal)	↓-n (infancy , not neonatal)	-	BH4 test negative
GTP Cyclohydrolas e deficiency arGTPCH	GTP Cyclohydrolas e deficiency	n-↑	↓↓	↓↓			↓	↓↓	GTPCH activity, cytokine stimulated in fibroblast	BH4 test +++
6-pyruvoyl- tetrahydropte rin synthase deficiency PTPS	6-pyruvoyl- tetrahydropter in synthase deficiency	↑	↓↓↓	↑↑↑			↓↓	↓↓	Prolactin (P) PTPS activity (RBC and FB)	BH4 test ++
Dihydropterid ine reductaza deficiency DHPR	Dihydropterid ine reductaza deficiency	↑	n-↑	n	↑↑	-	↓↓	↓↓	Dihydropterid ine reductaza (DBS) Prolactin(P)	BH4 test +
Pterin-4a- carbinolamine dehydratase deficiency Primapterinu ria PCD	Pterin-4a- carbinolamine dehydratase deficiency	↑		↑↑	-	-	-	-	Primapterin (U) ↑↑	BH4 test +
Dopa responsive dystonia Segawa disease DRD	GTP Cyclohydrolas e deficiency	n	↓	↓	-	-	↓-n	↓	-	Phe test +
Sepiapterin reductase deficiency SR	Sepiapterin reductase deficiency	n	↑	n	-	-	↓↓↓	↓↓↓	Dihydropterid ine reductaza (DBS) ↑↑ Prolactin(P) ↑ Sepiapterin (CSF) ↑↑	Phe test negative

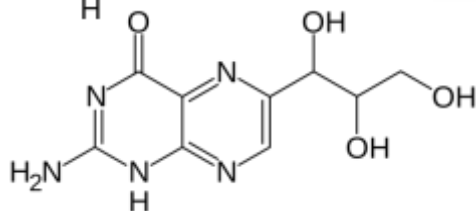
Substances of interest

Biopterin



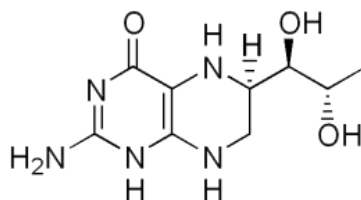
type of biological sample
SERUM, URINE, DRIED BLOOD
SPOTS, CSF

Neopterin



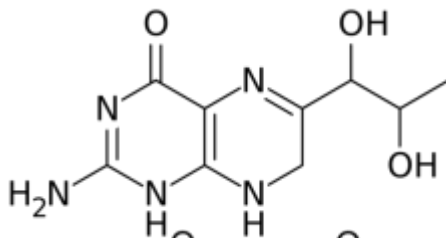
type of biological sample
SERUM, URINE, DRIED
BLOOD SPOTS, CSF

BH4 -
Tetrahydrobiopterine



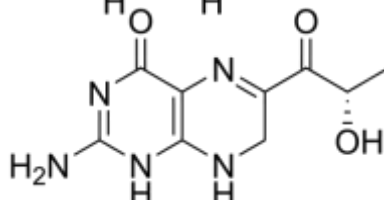
type of biological sample
CSF

Dihydrobiopterine



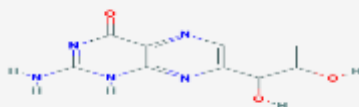
type of biological sample
CSF

Sepiapterine



type of biological sample
CSF

Primapterine



type of biological sample
Urine

Depistare

„We consider that treatment should be initiated before the age of 10 days, which for many countries will require change in timing of national NBS, logistical and diagnostic procedures.” –European Guidelines on PKU

Program National de Screening

- Screeningul national a debutat ca program de sanatate publica in America in 1960.
- Debut \approx 1975 la IOMC initiatori Prof. Dr. R. Priscu, Dr. S. Sichitiu si continuatori As. Z. Daneliuc, Dr. E. Tomescu.
- Generalizat la nivel national \approx 2009

5 centre -Bucuresti

- Cluj

- Iasi

- Tg. Mures

- Timisoara

Activitate / 2 placi	Timp estimat alocat
Inregistrare plicuri	15 min
Realizare matrita in caiet	30min
Capsare spoturi	15-20min
Realizare matrita in calculator	30min
Parcurgere metoda	3h30min
Verificare, interpretare, printare si eliberare rezultate	1h
Exportare date in aplicatia Medilog	30min
	Total - 7h

Total nou nascuti 2017 – 191 694

Centru	Nr de determinari	Personal
Bucuresti (25 judete + Bucuresti)	91300 nou nascuti 1380 monitorizati 2248 nou nascuti Timisoara(iunie –august) Total 94 958	2 pers part time
Cluj (7 judete)		
Iasi (6 judete)		
Tg. Mures (1 judet)		
Timisoara (2 judete)		

Monitorizarea

Since the introduction of NBS and early treatment, patients with PKU no longer develop profound and irreversible intellectual disability. Over the last 40 years, studies have demonstrated that it is unsafe to stop treatment during childhood and pre-adolescence

STATEMENT 20. Grade of recommendation: C
Treatment should start as soon as possible, ideally before 10 days of age.

STATEMENT 21. Grade of recommendation: C
No treatment is recommended when untreated blood Phe levels are $<360 \mu\text{mol/l}$. Monitoring of blood Phe (at a lower frequency) until 1 year of age as a minimum is recommended to determine whether levels rise above $360 \mu\text{mol/l}$.

STATEMENT 22. Grade of recommendation: C
All patients with untreated blood Phe levels $>360 \mu\text{mol/l}$ should be treated. Patients with untreated Phe levels $360\text{--}600 \mu\text{mol/l}$ should be treated until the age of 12 years.

Because of the possibility of blood Phe concentrations increasing with age, patients with Phe levels $<360 \mu\text{mol/l}$ should be monitored (at a lower frequency) during the first year of life as a minimum.

La pacientii diagnosticati cu PKU sau hiperfenilalaninemie se recomanda masurarea periodica a fenilalaninei din sange:

- in timpul primului an de viata testarea pentru fenilalanina ar trebui facuta saptamanal
- intre un an si 12 ani testarea ar trebui facuta de 2 ori pe luna
- dupa 12 ani lunar
- la femeile insarcinate care au PKU de doua ori pe saptamana dupa conceptie.

STATEMENT #10. Grade of recommendation: B

In treated PKU patients up to the age of 12 years, target Phe levels should be 120-360 $\mu\text{mol/L}$.

STATEMENT #11. Grade of recommendation: D

In treated PKU patients aged ≥ 12 years the target Phe levels should be 120-600 $\mu\text{mol/L}$.

STATEMENT #14. Grade of recommendation: ✓

Frequency of blood Phe measurements should be at minimum:

Age	Frequency
0 - 1 year	weekly
1 - 12 years	fortnightly
>12 years	monthly
Pregnancy: pre-conception	weekly
while pregnant	twice weekly

Increased frequency on indication (treatment changes, clinical grounds, adherence issues).

Considering the Phe:Tyr ratio, it is hypothesed that an increased Phe:Tyr ratio leads to dopamine deficiency as Phe and Tyr compete to cross the blood–brain barrier

STATEMENT #15. Grade of recommendation: ✓

Frequency of outpatient visits:

Outpatient clinic visits should be at minimum, given good clinical and metabolic control:

Age	Frequency
0 - 1 years	every 2 months
1 - 18 years	twice per year
>18 years	once per year
Pregnancy	once per trimester

Increased frequency on indication (treatment changes, changes in social circumstances (such as change of school, leaving home), clinical grounds, and adherence issues).

Dozarea Phenilalaninei

proba primara este reprezentata de spot de sange uscat (DBS)

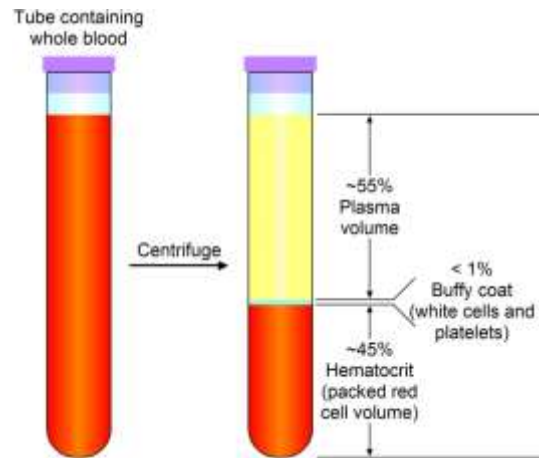


•*Tehnica FEIA: linie
automata TECAN*



Dozarea Phenilalaninei

proba primara – plasma recoltata pe EDTA de Na.

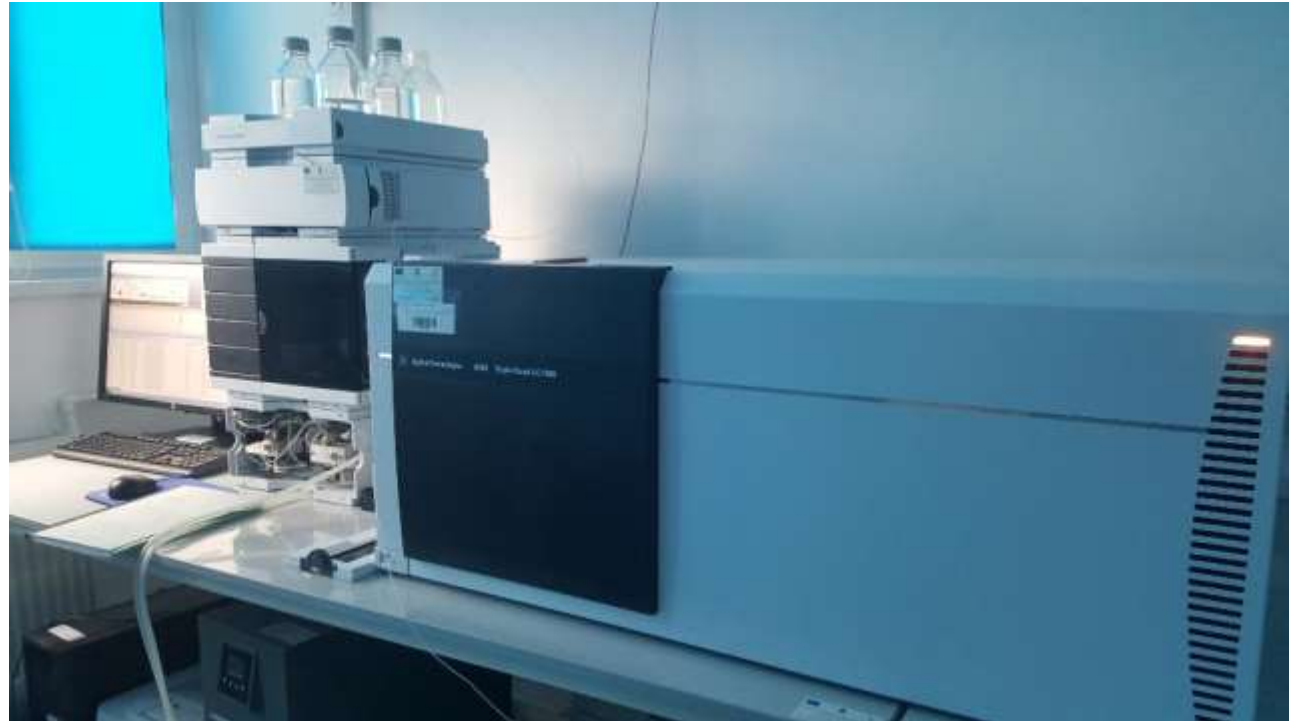


• *Lichid cromatografie*
UHPLC



Dozarea Aminoacizilor si Carnitinelor

- *Spectrometrie de masa*
- *LC MS/MS TQ*



Cromatograma si model de buletin

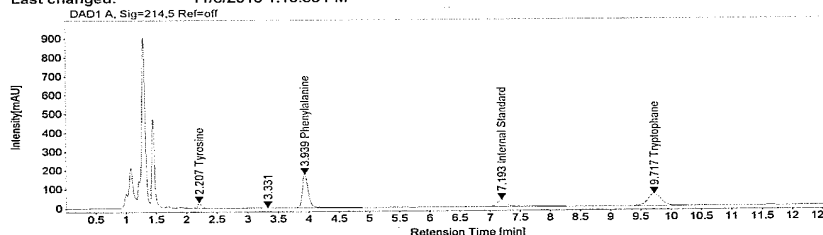
INSMC - Aminoacizi aromatici



Data file: D:\REZULTATE_UHPLC\08nov2016\08112016 2016-11-08 09-51-59
 \SIG10000017.D
 Sample name: 445086
 Description:

Instrument: HPLC_Aminoacizi
 Injection date: 11/8/2016 1:54:08 PM
 Acq. method: AAA_1.M
 Analysis method: AAA_1.M
 Last changed: 11/8/2016 1:16:38 PM

Location: 2 of 2
 Injection: 20.000
 Injection volume: 20.000
 Acq. operator: SYSTEM



Signal: DAD1 A, Sig=214.5 Ref=off

Name	RT [min]	RF	Area	Peak Height	Compound Amount	Compound Unit
Tyrosine	2.207	9.616	132.653	30.479	0.593	mg/dl
Phenylalanine	3.939	9.849	1227.892	178.981	5.619	mg/dl
Internal Standard	7.193	1.000	430.471	37.170	0.200	mg/dl
Tryptophane	9.717	2.216	960.353	64.591	0.989	mg/dl

Institutul National pentru Sanatatea Mamei si Copilului
 "Alessandrescu-Rusescu" BD. Lacul Tei, Nr. 120 Sector 2, Bucuresti Tel: 021 242 27 13

Buletin de analize medicale

PG-27/F1,V.1

Inregistrat de:
 Data setului de analize: 07 Nov 2016 10:14:00
 Data recoltarii: 07/11/2016 10:16
 Data primirii in laborator:

DUPLICAT Cod cerere: 445086

Nume: Varsta: 2 ani - 2 luni - 20 zile Gen: M Medic:
 C.N.P.: Cod pacient: 423300000107794 Sectia: Pediatrie II (Izolare 2) Salon: S2

BIOCHIMIE (MANUAL BIOCHIMIE) - LUCRAT DE : CORINA-ELENA BIOCHIMIST PR. DELIA; LA ORA:
 08/11/2016 16:34

Aminoacizi aromatici (Plasma EDTA-UHPLC)

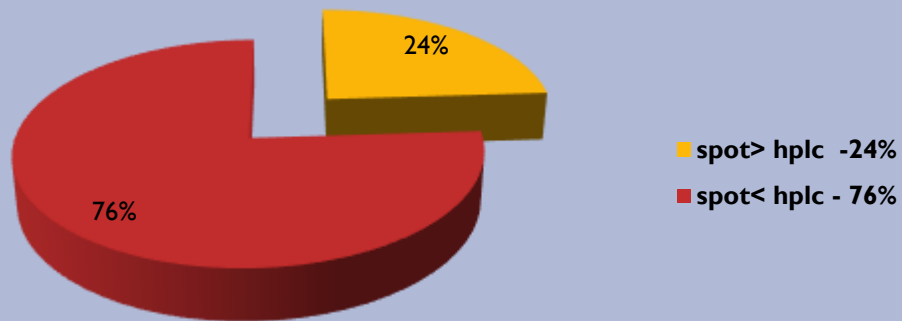
ANALIZE	REZULTATE	Interval biologic de referinta / UM
Tyrozina	0.69	0.6 - 1.5 / mg/dL
Phenilalanina	5.61	0.6 - 1.1 / mg/dL
Tryptofan	0.99	0.1 - 1.2 / mg/dL
Raport Phe/Tyr	8.13	

*Aminoacizi aromatici: Valorile de referinta sunt specifice pacientilor fara PKU. Pentru pacientii cu PKU valorile se interpreteaza in context clinic de catre medicul specialist.

Observatii laborator:

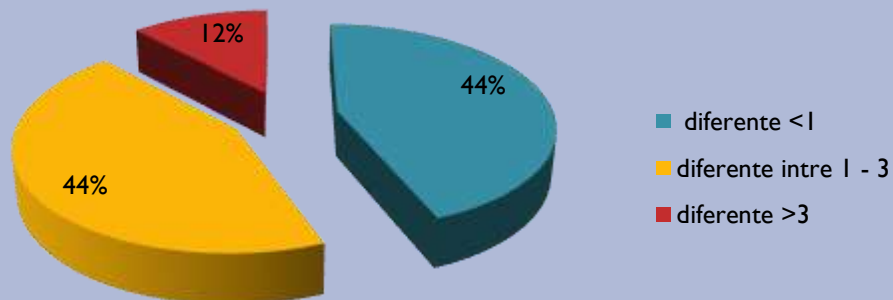
Comparatie rezultate obtinute pe FEIA cu HPLC

FEIA vs UHPLC



Spot > HPLC	24%
Spot < HPLC	76%

Distribuita pentru valori de Phe mai mari pe HPLC fata de spot



diferente < 1	44%
diferente intre 1 - 3	44%
diferente > 3	12%

Comparatie rezultate obtinute prin tehnica FEIA cu cele pe LC MS/MS

Tip de proba – spot de sange uscat.

Rezultatele sunt in proportie de 99% identice in ceea ce priveste probele de screening.

Media diferentei valorilor obtinute prin cele doua metode este de 0.1.

Rezultatele insa prezinta o variabilitate asemanatoare cu cea dintre FEIA vs HPLC in ceea ce priveste monitorizatii.

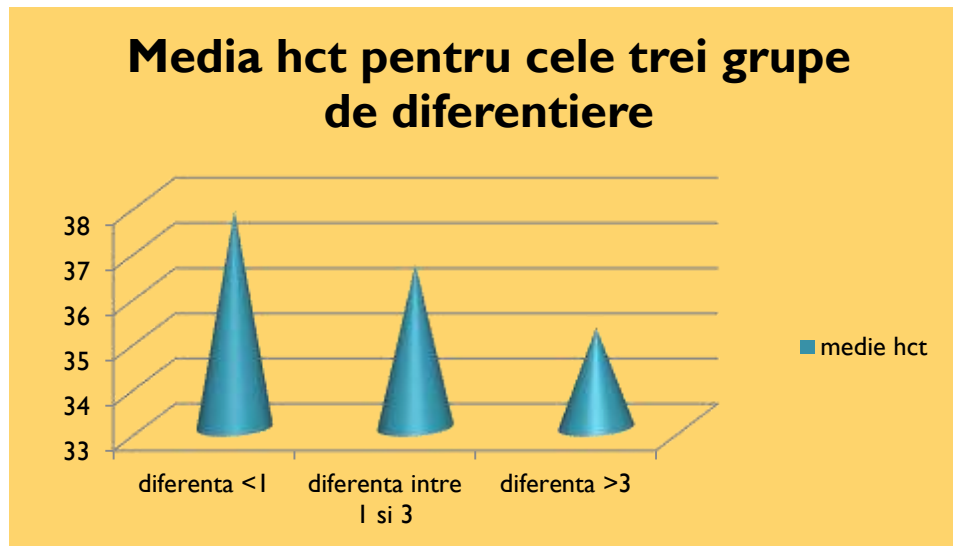
Observatie: Nu luam in calcul decat Phe, nu si restul de aminoacizi.

Nu exista valori de referinta pe categorii de varsta pentru toti aminoacizii determinati din DBS.

Factori de influenta

Calitatea recoltarii pe spot, de multe ori se recolteaza foarte putin si spotul este neuniform si pe o arie foarte mica (dimensiunea spotului decupat fiind de 3 mm in diametru) . La probele de plasma este exclusa aceasta posibilitate.

Hematocritul este un important factor de influenta, deoarece acesta poate fluctua.



	medie hct
diferenta <1	37.8
diferenta intre 1 si 3	36.6
diferenta >3	35.2

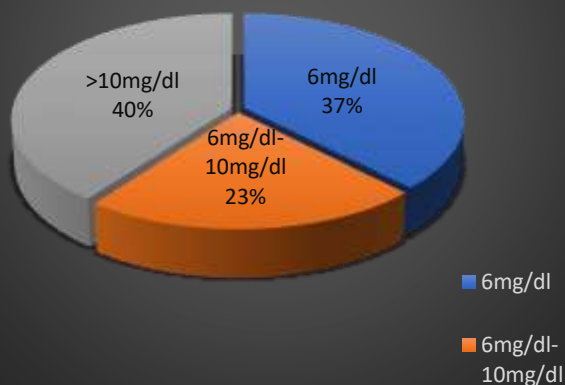
Diferente foarte mici exista la copii al caror hematocrit se situeaza cat mai aproape de valoarea de 50-55% (dupa cum este specificat in insertul kit-ului)



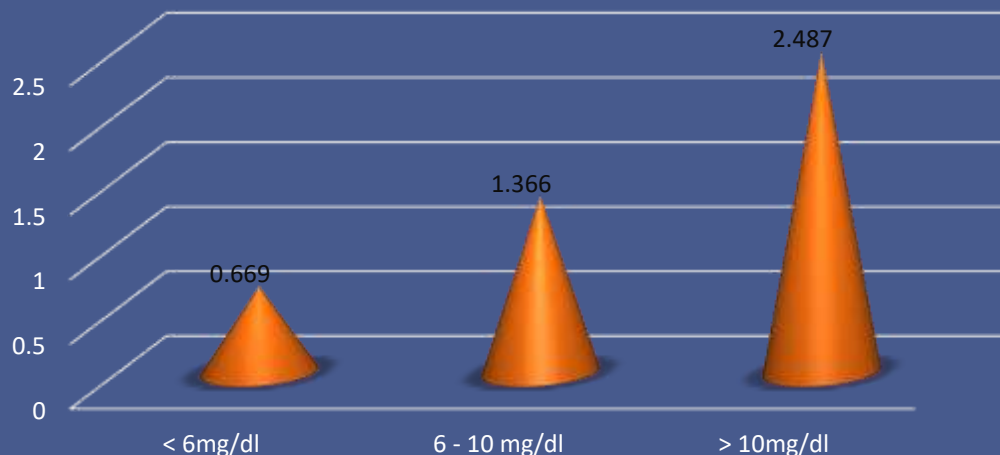
Hematocrit	Medie diferente
hct 27,4% - 33%	1,86
hct 33% - 36%	1,76
hct 36% -45,8%	1,41

- Am comparat rezultatele obținute prin cele 2 tehnici și datele am fost împărțit în 3 categorii (intervale de concentrație) :
- Pacienți care prezintă o valoare a concentrației de Phe determinată în plasmă mai mică de 6mg/dl ;
- Pacienți care au o concentrație a fenilalaninei în plasmă cuprinsă între 6 mg/dl-10mg/dl;
- Pacienți a căror concentrație de Phe determinată prin HPLC depășește 10 mg/dl.

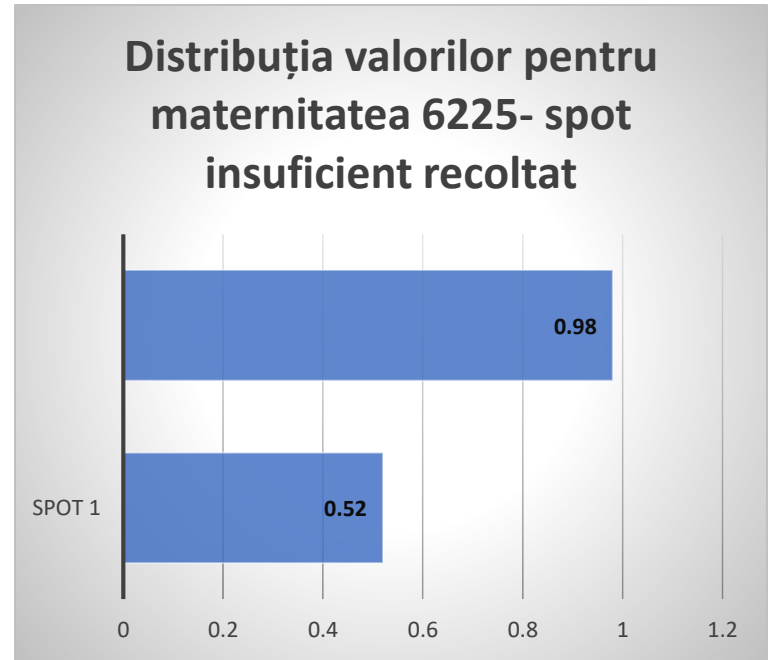
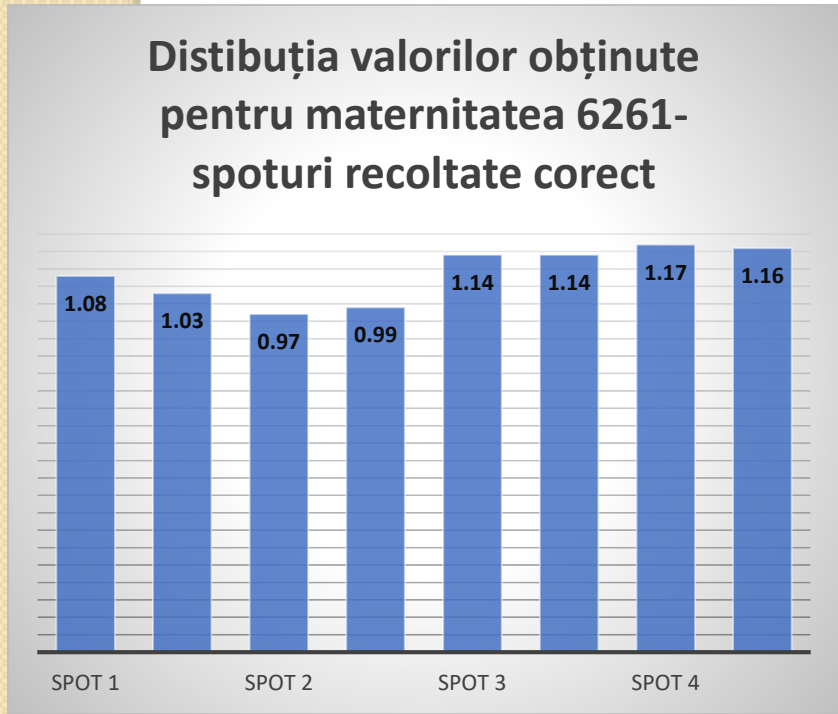
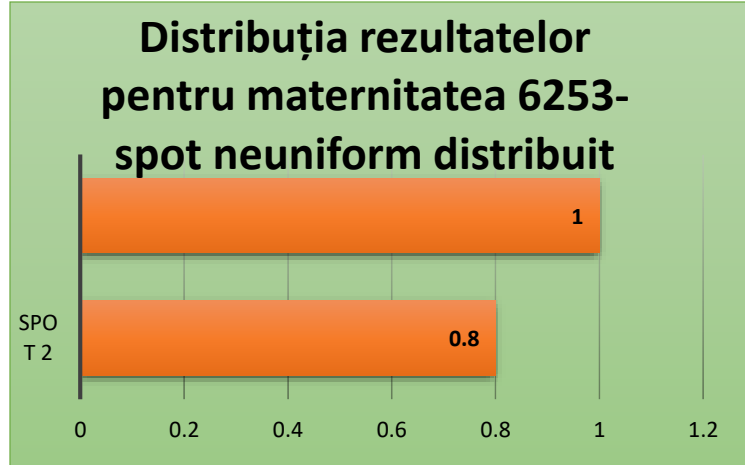
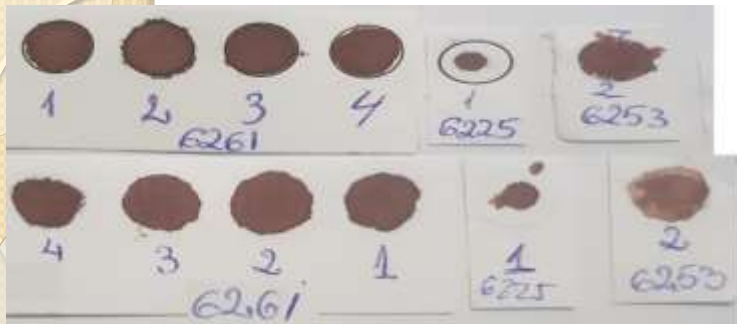
Distribuția rezultatelor pentru fiecare interval de concentrație a Phe



Media diferențelor dintre FEIA și HPLC pentru cele 3 intervale ale concentrației de fenilalanină



Media diferențelor dintre FEIA și HPLC pentru cele 3 intervale ale concentrației de fenilalanină



Metodologia de recoltare si trimitere a probelor pentru determinarea de Aminoacizi aromatici

Am elaborat protocol de recoltare si trimitere probe de plasma impreuna cu coordonatorii interventiei.

Metodologia de recoltare si trimitere a probelor pentru determinarea de Aminoacizi aromatici

1. Recoltarea si prelucrarea probelor

Ce se recolteaza?

Se recoltează sange venos .

Pe ce se recolteaza?

Recipient cu anticoagulant - EDTA, volum minim 1.2ml, cu staza venoasa moderata si se agita pentru a impiedica formarea cheagului.

Cand se recolteaza?

De preferat in cursul diminetii. Proba primara va fi dusa ulterior la laborator in vederea centrifugarii si separarii plasmei, in recipient cu dop infiletat si cu zona de etichetare pe care TREBUIE mentionate numele pacientului si data recoltarii. Plasma astfel prelucrata este stabila 2 zile la 2-8°C.

Unde se recolteaza?

La orice punct de recoltare autorizat si care sa permita prelucrarea ulterioara a probei in conformitate cu cele mentionate mai sus.

Centrifugarea probelor de sange in vederea obtinerii plasmei: se poate efectua imediat ce proba a fost receptionata in laborator, la 3500-4000rpm timp de 5min.

Volumul minim de plasma – **200microlitri**, se separa in recipient cu dop infiletat si cu zona de etichetare pe care TREBUIE mentionate numele pacientului si data recoltarii. Probele de plasma astfel prelucrate sunt stabile 2 zile la 2-8°C.

Daca trimiterea recipientelor cu plasma intarzie peste acest termen de 2 zile, acestea necesita congelarea la -20°C.

Identificarea probelor

Se completeaza bonul de trimitere cu datele de identificare, dupa cum urmeaza: Nume, Prenume, CNP, Localitate, Judet, Medic trimitator, Medic coordonator de program si data recoltarii. Datele se inscriu corect si citet, pentru a se putea identifica ulterior fiecare copil si pentru introducerea ulterioara in baza de date a Sistemului Informatic de Laborator al laboratorului de referinta.

2. Trimiterea probelor la laboratorul de referinta

Recipientele cu plasma vor fi ambalate INDIVIDUAL in saculeti de pastic etans, impreuna cu datele pacientului notate foarte clar si astfel pastrate la frigider/ congelator pana la trimitere.

ATENTIE! Exclus a se trimite datele pacientilor sub forma tabelara.

Recipientele cu plasma se trimit prin posta sau prin curier la adresa laboratorului de referinta – INSMC Alessandrescu Rusescu, Bdul Lacul Tei, nr.120, Bucuresti, sect.2.

Calitate dintr-o singura picatura de sange

- Acreditare RENAR ISO 15189/2013
- Control extern de calitate la CDC Atlanta

Estimarea incertitudinii de masurare

Phe plasmatica

- nivel I (1.31mg/dl) - 0.12
- nivel II (5.23mg/dl) - 0.42

Phe FEIA

- nivel I (2.1 mg/dl) - 0.21
- nivel II (5.8 mg/dl) - 0.48

Concluzii

Concluzie: Ambele metode abordate in laboratorul nostru sunt si vor fi utilizate in monitorizarea pacientilor cu PKU, rezultatele fiind concordante, cel putin pentru valori 6 mg/dl

FEIA

Avantaje:

- Este o analiza acreditata RENAR 15189/2013
- Probele pot fi usor recoltate de catre parinti si trimise prin posta/curier

Dezavantaje

- Nu reprezinta o metoda de referinta

UHPLC

Avantaje:

- pe langa faptul ca este o tehnica de referinta, ofera informatii privind si aminoacidul Tirozina si raportul

Phenilalanina/Tirozina

Dezavantaje:

- Necesita recoltare venoasa.

LC MS/MS

Avantaje:

- Probele pot fi usor recoltate de catre parinti si trimise prin posta/curier

Dezavantaje:

- Este o metoda mai scumpa, mai dificil de lucrat – timp de raspuns mai mare.
- Este recomandata pentru screening de aminoacizi si carnitine si reprezinta o cheltuiala inutila.
- Nu exista valori de referinta pe categorii de varsta pentru toti aminoacizii determinati din DBS.

Sperante

In Romania se realizeaza screening prin program national pentru doua boli Fenilcetonurie si Hipotiriodism congenital. In Austria pentru 29 boli, in Ungaria 22 boli, in Germania peste 30 boli, in America peste 44 boli etc.

Tulburarile metabolice congenitale nu pot fi vindecate complet, dar tratamentul precoce va reduce sau chiar va preveni aparitia simptomelor grave, care afecteaza dezvoltarea copilului si **TREBUIE** sa dovedim impreuna consecventa in continuarea si extinderea screeningului neonatal.

Este nevoie de o viziune unitara si concertata, cu concursul INSMC si o finantare corespunzatoare.

Mesaj de luat acasa

Munca de echipa!
Echipa multidisciplinara

**A fi împreună este un început,
a rămâne împreună este un progres,
a lucra împreună este un succes.**

Henry Ford

A photograph of a sunset over a forest. The sun is a bright yellow circle in the center, surrounded by a red and orange glow. The sky transitions from red to dark purple. In the foreground, there are dark silhouettes of trees and a body of water reflecting the sunset. The text is overlaid in white, with 'ÎNCEPUT!' in a larger, bold font.

Fiecare sfârșit
este un nou
ÎNCEPUT!