



A CORUÑA 2008

II CONGRESO NACIONAL DE LABORATORIO CLÍNICO

PALEXCO

4-7 JUNIO 2008



Perspectivas de futuro: alianzas y nuevas determinaciones



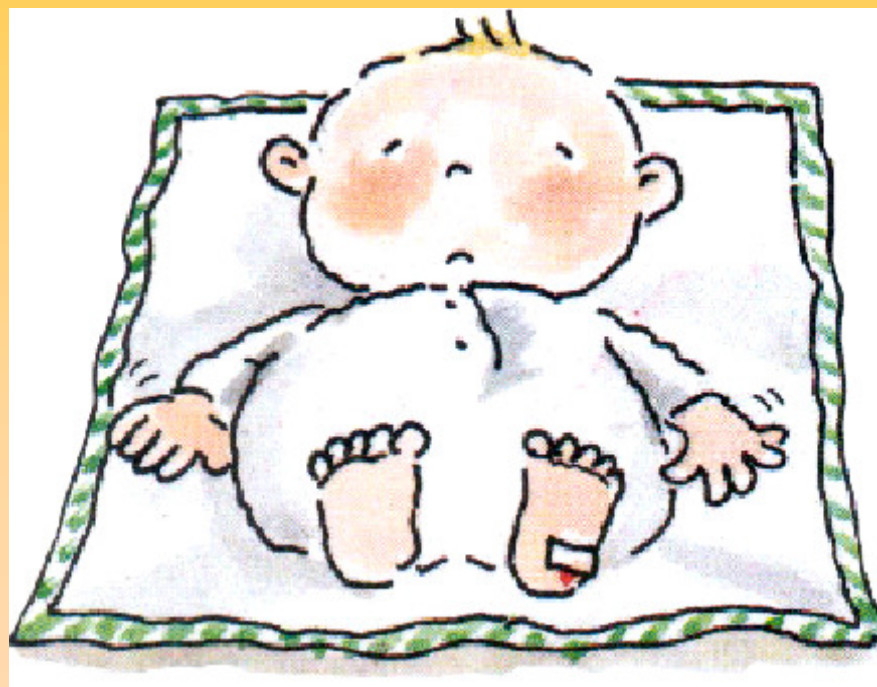
Daisy Castiñeiras Ramos
Laboratorio de Metaboloopatías
Hospital Clínico Universitario
Santiago de Compostela

Perspectivas de futuro: alianzas y nuevas determinaciones



- 1 - Nuevos cribados
- 2 - Pruebas de segundo nivel como ayuda al enfoque diagnóstico. Algoritmos de decisión.
- 3 - Alianzas, necesidad de aunar esfuerzos y rentabilizar costes. Panel único uniforme.

Propuesta de nuevos Cribados



Propuesta de nuevos Cribados



- Cribado de Enfermedades de Deposito Lisosomal.
- Cribado ampliado utilizando la muestra de orina impregnada en papel.
- Cribado de desordenes hepatobiliares colestaticos.
- Cribado Neonatal para la Enfermedad de Wilson
- Cribado de desordenes del la síntesis de la creatina.
- Cribado Neonatal para la Inmunodeficiencia combinada severa

Cribado de Enfermedades de Depósito Lisosomal.



- Existen clasificadas más de 40 enfermedades de depósito lisosomal
- Cada una con un déficit enzimático distinto.
- Juntas se presenta en 1/7700 recién nacidos.
- La presentación clínica es muy variable



Clasificación:

- Mucopolisacaridosis
- Oligosacaridosis
- Esfingolipidosis
- Enf. Depósito de glucógeno
- Defectos transporte lisosomal
- Def. enzimáticas múltiples

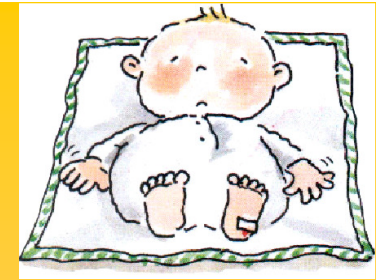
POSIBLES VÍAS DIAGNÓSTICO PRECOZ



- Medida de actividad enzimática
- Cuantificación de enzima (concentración de proteína)
- Cuantificación de metabolitos en orina.

MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Mét. Fluorimétricos



- Miden la rotura catalizada por el enzima de un sustrato fluorescente artificial.
- Derivados de la *4-metilumbeliferona*, por ejemplo: *4-metilumbeliferil- α -D-glucopiranosido* para la enfermedad de Pompe.

MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Mét. Fluorimétricos



MÉTODOS FLUORIMÉTRICOS

POMPE

MPSI

TAY-SACHS

SANDHOFF

GAUCHER

NIEMANN-PICK

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA POR MS/MS



- Múltiples Medida actividad 5 enzimas simultáneamente. (*Clin Chem 50:10 ;2004*)
- Potencial de expansión.
- Reacciones enzimáticas por separado.
- Reunión productos reacción previo a MS/MS.

MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Mét. MS/MS



MÉTODO MS/MS

FABRY

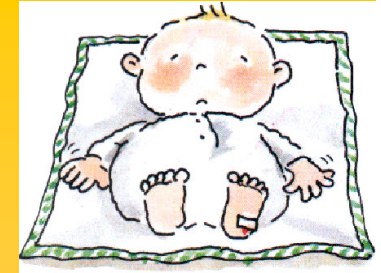
GAUCHER

KRABBE

NIEMANN-PICK A/B

POMPE

Cribado de Enfermedades de Deposito Lisosomal



- Desde este año hay disponible un control de calidad externo suministrado por el CDC (Center for Disease Control and Prevention) para el cribado de enfermedades de deposito lisosomal por espectrometría de masas en tándem para : Gaucher, Fabry, Pompe, Niemann-Pick A/B y próximamente para Krabbe

Cuantificación de enzima (concentración de proteína)



- Ensayo múltiple Inmuno cuantitativo para 11 enfermedades (pendiente de comercialización)
- Enfermedades a cribar:
 - Niemann-Pick A/B, Fabry, Pompe, Gaucher, MPS I/II/III A/IV, Leucodistrofia Metacromática, Deficiencia de Sulfatasa Múltiple

CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS EN ORINA POR MS/MS



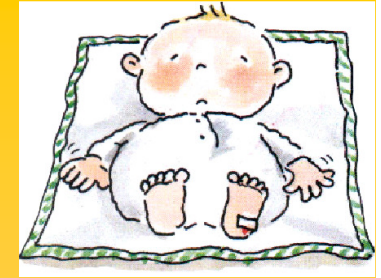
- OLIGOSACÁRIDOS:

Medida colorimétrica y posterior separación por cromatografía de capa fina para la tipificación

MUCOPOLISACARIDÓISIS:

Ensayo colorimétrico y posterior separación por cromatografía de capa fina para la tipificación

Cribado ampliado utilizando la muestra de orina impregnada en papel



- Se estudian 109 metabolitos
- Ionización Positiva: Aminoácidos, Acilcarnitinas.
- Ionización Negativa: Ácidos orgánicos, Acilglicinas, purinas y pirimidinas etc.
- Resultados referidos a creatinina

Patología	Metabolitos ionización positiva	Metabolitos ionización negativa
Aciduria 3-Hidroxi-3metilglutárica (HMG)*	Isovalerilcarnitina, 3-OH-Isovalerilcarnitina	Ác. 3-OH-3-metilglutárico, 3-Metilcrotonilglicina, Ác. 3-OH-Isovalérico
Def. Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD)*	Hexanoilcarnitina, Octanoilcarnitina	Hexanoilglicina, Ác. Adípico, Ác. Subérico, ...
Aciduria Isovalérica (IVA)*	Isovalerilcarnitina	Isovalerilglicina, 3-OHC5
Homocistinuria clásica*	Metionina, Homocistina	
Aciduria Propiónica*	Propionilcarnitina	Ác. 3-OH-Propiónico, Propioniglicina, ...
Aciduria 4-OH-Butírica°		Ác. 4-OH-butírico
Enfermedad de Canavan°		Ác. N-Acetilaspártico
Aciduria Mevalónica°		Ác. Mevalónico
Alcaptonuria°		Ác. Homogentísico
Aciduria Arginosuccínica°	Citrulina	Ác. Arginosuccínico
Cistinuria°	Cistina, Arginina, Ornitina	
Def. Guanidoacetato metiltransferasa (GAMT)°	Ác Guanidoacético, creatina	
		*Complementariedad con sangre, °Ampliación del cribado

MS/MS en Orina



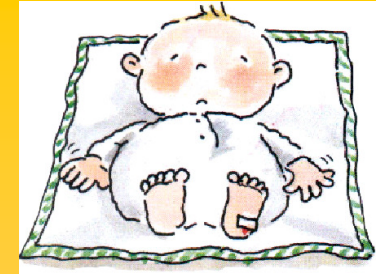
- Permite la detección simultánea de un elevado número de moléculas que son marcadores para el diagnóstico de ECM.
- La serie de muestras patológicas analizadas permitió contrastar la sensibilidad y la especificidad del método.
- El análisis de las muestras de orina permite completar, ampliar y complementar la información de acilcarnitinas y aminoácidos en sangre por MS/MS. (*Quím. Clín. 2006; 25 (2): 64-75.*)

Desordenes hepatobiliares colestáticos



- Cuantificación de ácidos biliares conjugados por Espectrometrías de Masas en Tándem
- Se utilizando la muestra de sangre en papel tomada entre el 7-10 día de vida para la detección de las enfermedades hepatobiliares colestáticas y atresia extrahepática biliar. (*Brit Med J* 319;471-477,1999)

Cribado Neonatal para la Enfermedad de Wilson



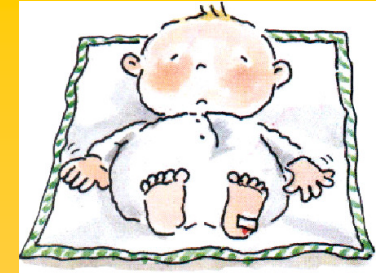
- Esta enfermedad se caracteriza por la reducida incorporación del cobre en la ceruloplasmina y por ello se reduce la excreción de cobre en bilis
- Esta enfermedad tiene tratamiento efectivo si se trata precozmente
- La clínica Mayo presentó un estudio piloto para el cribado de esta enfermedad utilizando un Elisa para la determinación de la ceruloplasmina.

Desordenes de la síntesis de la creatina



- Determinación de creatina y guanidinoacetato en las muestra de **sangre** impregnada en papel por MS/MS. *Clin Chim Acta 364;180-187,2006*
- Determinación de creatinina y guanidinoacetato en las muestra de **orina** impregnada en papel por MS/MS. (*Quím. Clín. 2006; 25 (2): 64-75.*)

Cribado Neonatal para la Inmunodeficiencia combinada severa



- Este es un desorden de la adaptación del sistema inmunitario que no presenta signos hasta que el niño no es infectado y entonces su vida ya está en peligro (síndrome del niño burbuja).
- Medida por PCR de TRECs (T-cell receptor recombination excision circles) pequeños fragmentos de DNA circular generados en el desarrollo de la células T
- Tratamiento: Transplante de médula ósea

**Pruebas de segundo nivel sobre la
misma muestra de sangre
impregnada en papel**



Pruebas de segundo nivel



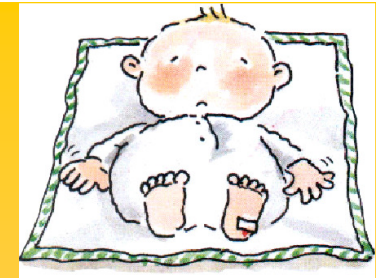
- Succinilacetona en sangre y/o orina (Tyr I).
- Hiperplasia Adrenal Congénita debida a la def. 21-hidroxilasas se estudia la 17OH-progesterona,
- Cuantificación de Ato Isoleucina y AA ramificados (MSUD).
- Glutarilcarnitina en orina impregnada en papel (GA I).
- Estudios genéticos : sobre la 1ª muestra de sangre en papel se estudia las mutaciones más frecuentes de la población ej.: fibrosis quística.

Succinilacetona en sangre y/o orina



- El diagnóstico precoz de la Tirosinemia tipo I utilizando como marcador bioquímico la Tyr presenta varios problemas:
 - Falsos negativos: prematuridad y/o inmadurez hepática, enfermedad hepática por infección ó enfermedad metabólica
 - Falsos positivos: pocas horas de alimentación protéica del neonato y por lo tanto la Tyr no se encuentra elevada.

Succinilacetona en sangre y/o orina



- La succinilacetona (SUAC) es marcador patognomónico de la Tirosinemia tipo I
 - Método para medir la SUAC en la muestra de sangre impregnada en papel conjuntamente con los AA AC. (*Clin Chem* 54:4:657-664, 2008)
 - Método para medir la SUAC en muestra de orina impregnada en papel. (*Quím. Clín.* 2006; 25 (2): 64-75.)

Hiperplasia Adrenal Congénita (HCA) debida a la def. 21-hidroxilasa



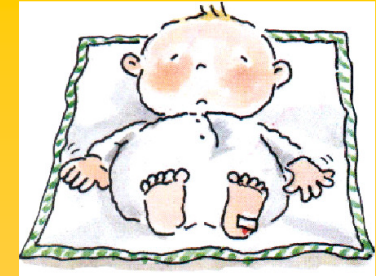
- Usualmente se estudia la 17- α -hidroxiprogesterona (17 OHP) por inmunoensayos. Pero estas prueba se caracterizan por un alto número de falsos positivos.
- El análisis de 17OHP, androstendiona y cortisol simultáneamente por Espectrometría de Masas en Tándem sobre la muestra de sangre en papel en aquellas muestras que dan positivo en el cribado convencional reduce de forma significativa el número de falsos positivos.

Cuantificación de Alo Isoleucina y AA ramificados

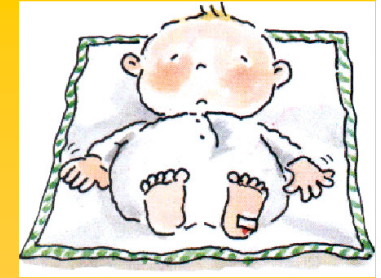


- El cribado de MSUD se realiza mediante la medida de AA ramificados (BCAAs) por MS/MS.
- El marcador patognomónico de esta enfermedad es la Aloisoleucina, pero esta no puede ser identificada debido a interferencia isobáricas e isoméricas (Opr, Ile, Leu)
- Aquellos RN que recibe alimentación parenteral a menudo ven incrementados los BCAAs.
- Método LC-MS/MS para cuantificación de Alo-Ile para reducir el número de falsos positivos. (*Clin Chem* 54:3, 2008 en prensa)
- Adaptación para BCAAs por cromatografía de intercambio iónico para la muestra de sangre impregnada en papel

Glutarilcarnitina en orina impregnada en papel.



- La glutarilcarnitina (C5DC) es el marcador para la detección de la Aciduria glutárica tipo I, en esta patología hay que considerar dos presentaciones bioquímicas:
 - **Acidurias glutarica I** en la que existe una **alta excreción** de Ácido glutárico y 3-hidroxiglutarico y C5DC en sangre
 - **Acidurias glutáricas no excretoras** en las que únicamente se puede observar **pequeñísimas** cantidades de 3-hidroxiglutarico.
- Para la detección de ambas presentaciones se baja el punto de corte de C5DC en sangre y se mide la C5DC en orina impregnada en papel por MS/MS (*Mol Genet Metab. 2005 Feb;84(2):137-43*).



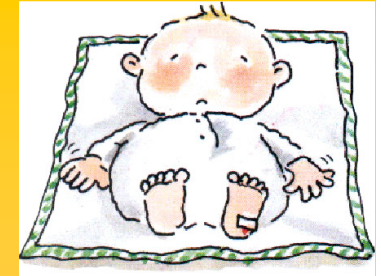
Estudios genéticos

- En el cribado de fibrosis quística la medida de IRT por inmunoensayos presenta un alto número de falsos positivos.
- El estudio de las mutaciones más frecuentes entre la población cribada se realiza como prueba de segundo nivel reduciendo de forma significativa el número de repeticiones.

Algoritmos de decisión



- Muchos marcadores, lo son de distintas patologías. Por ello es necesario el utilizar algoritmos de decisión para el correcto diagnóstico y posterior tratamiento de la enfermedad.
- Ejemplo de algoritmo de decisión para discernir entre las varios posibilidades diagnóstica que se abren ante un marcador alterado.



C5OH elevada

3MCC
3 MetilGlutacónico Aciduria

+C5:1elevada
 β KT, MHBD

+ C6DC elevada
HMG

+C3 elevada
Def. Multiple de Carboxilasa

<http://www.acmg.net/resources/policies/ACT/condition-analyte-links.htm>



C5 elevada

Acidemia Isovalérica
Isovalerilglicina

SBCAD
3 metil butirilglicina

Tto con antibióticos
Ácido Piválico

<http://www.acmg.net/resources/policies/ACT/condition-analyte-links.htm>

Alianzas



Alianzas



- Proyecto colaborativo para la mejora de la calidad de los laboratorios de Cribado Neonatal por MS/MS (Region4Genetics)
- Panel único uniforme
- Necesidad de unificar recursos tanto personales como instrumentales para rentabilizar el coste de la ampliación del Cribado

Proyecto internacional de colaboración Región4



Objetivo: Recoger los resultados obtenidos de al menos 50 casos de todas las enfermedades para el establecimiento del percentil 5 de la población enferma para cada enfermedad y proponer puntos de corte para cada uno de los analitos implicados en el diagnóstico de dichas enfermedades

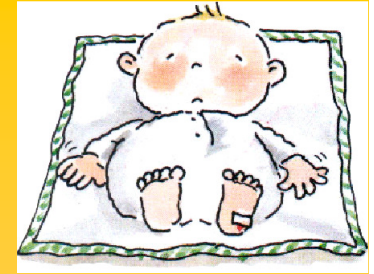


Proyecto colaborativo para la mejora de la calidad de los laboratorios de Cribado Neonatal por MS/MS (Region4Genetics)



- Cerca de 100 laboratorios (49 fuera de EEUU)
- Mejorar el rendimiento analítico
- Alcanzar uniformidad de paneles de metabolitos para una máxima eficacia
- Al menos 50 pacientes por grupo
- Solo detecciones < 7 días
- Establecimiento de puntos de corte
- Evaluación individual de parámetros de calidad y su mejora continua

Panel único uniforme



- El *Maternal and Child Health Bureau (MCHB)* de la *Health and Resources and Services Administration (HRSA)* norteamericana comisiona a la *American College of Medical Genetics (ACMG)* para elaborar el documento:
Newborn Screening: Toward a Uniform screening panel and systems
(<http://mchb.hrsa.gov/screening/>)

Panel único uniforme



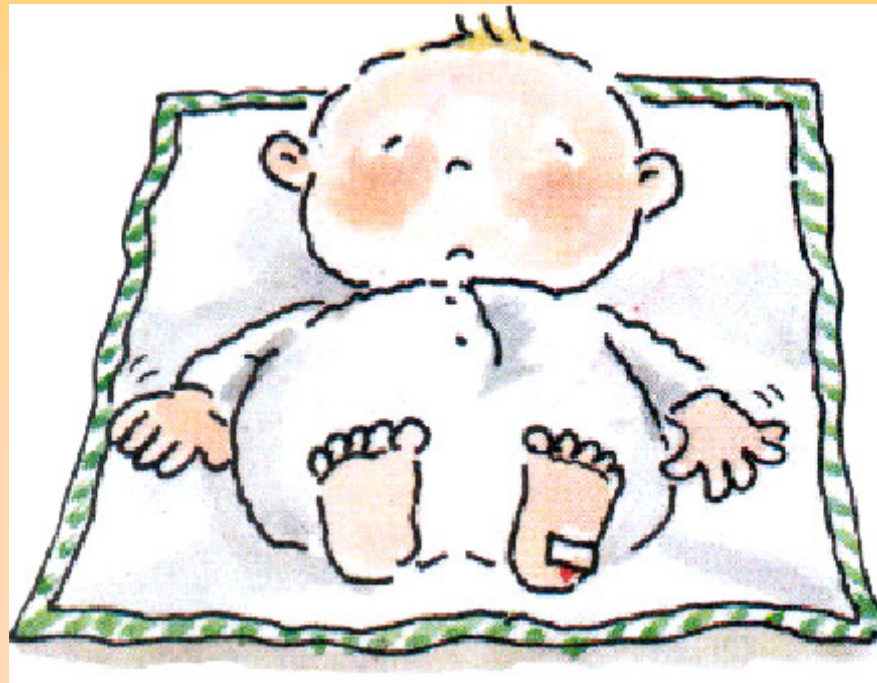
- En el documento establece los principios básicos y propone los criterios según los cuales se debe evaluar las alteraciones que podrían ser cribadas.
- De esta forma categoriza 84 enfermedades según el conocimiento y la evidencia disponible.
- Así salen 29 patologías con puntuación alta para las que considera rentable el cribado.

Alteraciones que recomienda incluir en Cribado Neonatal la ACMG



- Alteración del metabolismo de los ácidos grasos: MCAD, VLCAD, LCHAD, TFP, TUD
- Alteración del metabolismo de los ácidos orgánicos: IVA, GA I, HMG, MCD, MMA-mut, MCC, MMA-Cbl A,B, PA, BKT
- Alteración del metabolismo de los aminoácidos: PKU, MSUD, HCY, CIT, ASA, TYR I
- Hemoglobinopatías: HbSS, Hb S1β/Th, Hb S/C.
- Otras alteraciones: HC, BIOT, CAH, GALT, HEAR, CF

Grupo de trabajo a nivel Español para elaborar un documento en el que recomiende los cribados mínimos que se deben ser abordados en todo el territorio.



...Gracias

