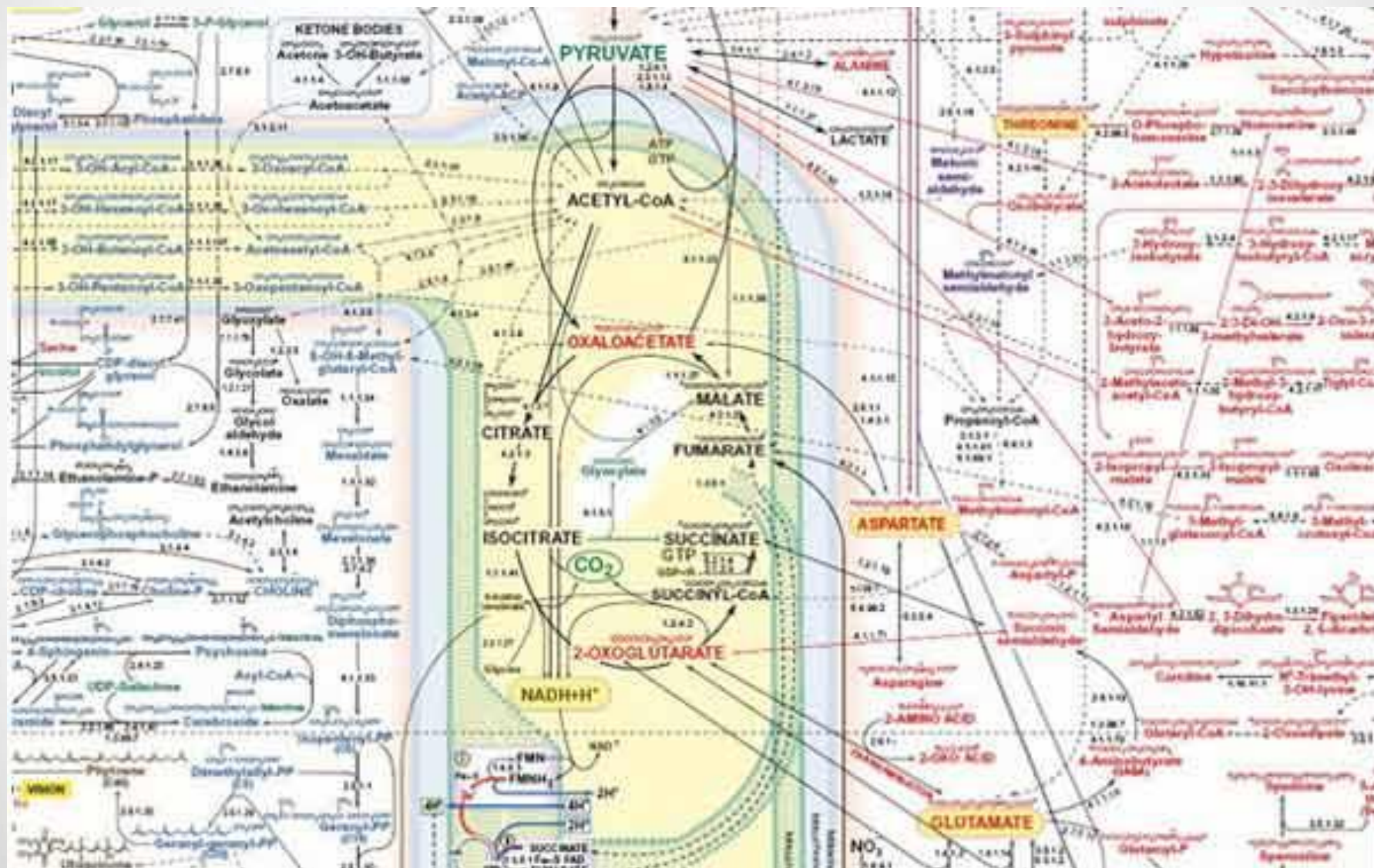


Лабораторна аналітика та діагностичні алгоритми розширеного неонатального скринінгу

Кузнецов Ігор
д.б.н., професор, директор
Клініко-діагностичного центру
«ФАРМБІОТЕСТ» м. Рубіжне, Україна

www.pharmbiotest.com

Метаболізм – комплекс хімічних процесів, які відбуваються в клітинах живого організму, деякі з яких можливо контролювати, більшість – не можливо



Спадкові хвороби обміну речовин (СХОР)

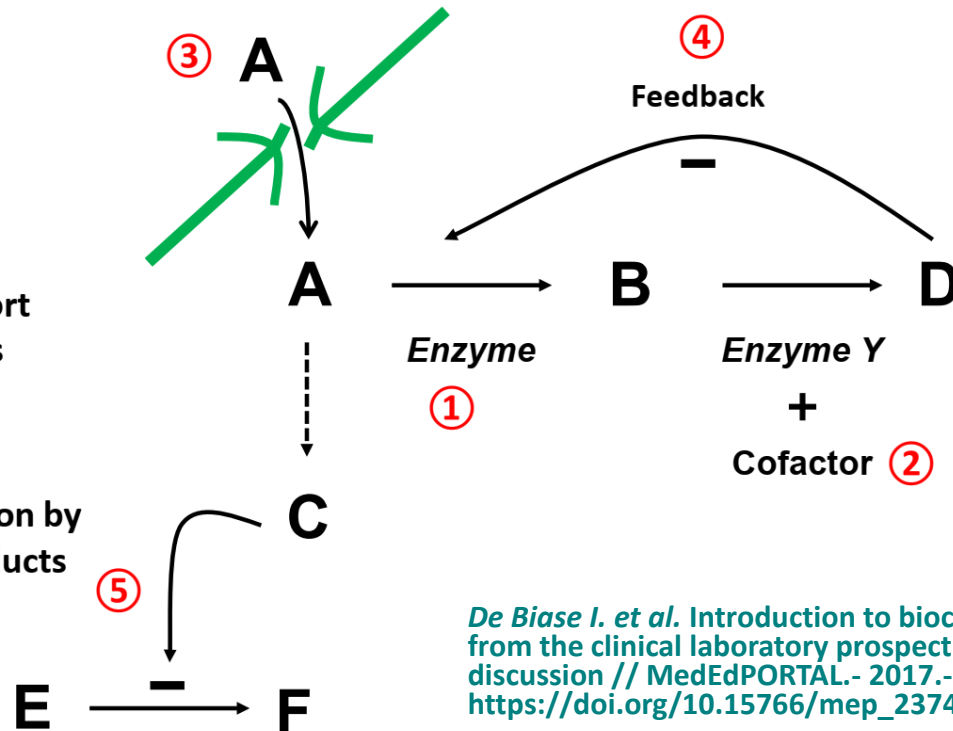
① Enzyme defect

② Cofactor defects

③ Decreased transport across membranes

④ Lack of feedback

⑤ Secondary inhibition by alternative byproducts



De Biase I. et al. Introduction to biochemical genetics from the clinical laboratory prospective: a case-based discussion // MedEdPORTAL.- 2017.- Vol. 13:10586. https://doi.org/10.15766/mep_2374-8265.10586

Спадкові хвороби обміну речовин – генетичні порушення, що впливають на метаболічні шляхи.

Клінічні ознаки і симптоми визначаються:

- накопиченням субстратів
- дефіцитом продуктів
- накопиченням альтернативних токсичних побічних продуктів

Точкова мутація гена як причина метаболічного блоку

Спадкові хвороби обміну – моногенні захворювання, причина яких – точкові мутації генів і, відповідно, синтез дефектних білків, що виконують структурні, ферментативні, транспортні, сигнальні, імунні та інші функції.

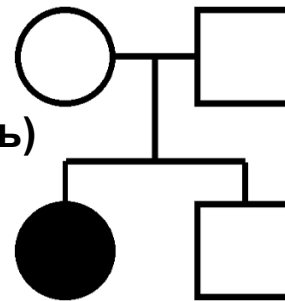
Тип наслідування:

Аутосомно-рецесивний (більшість)

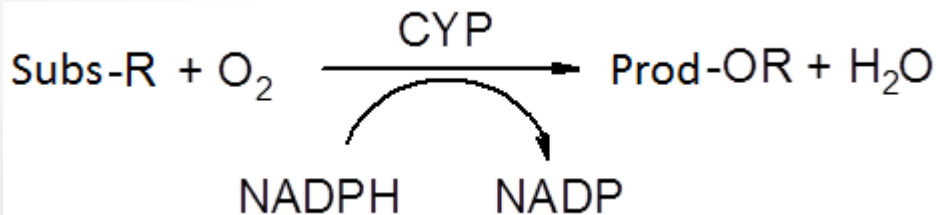
Х-зчеплений

Мітохондріальний

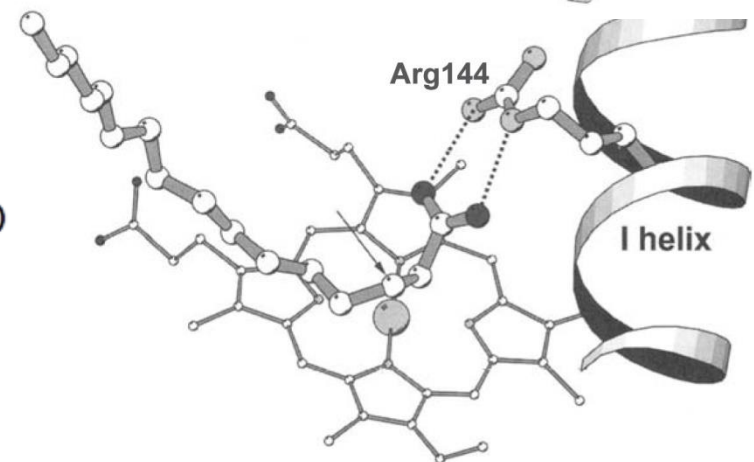
Аутосомно-домінантний (рідко)



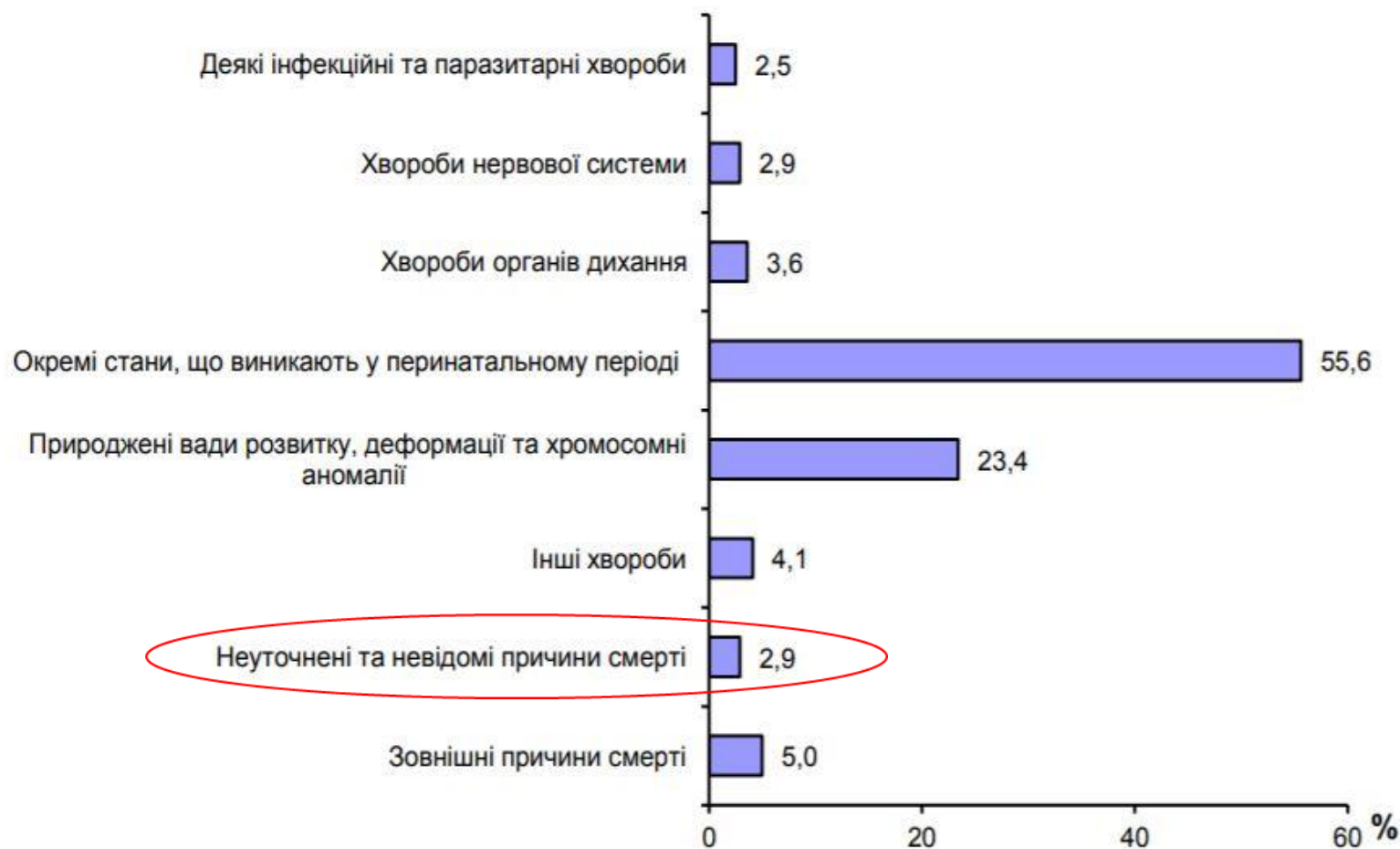
Відомо близько 6000 СХОР, до МКБ-10 внесені 250. Кумулятивна частота – 1 на 500-800 новонароджених.



oxidative dealkylation (oxidation of the methyl group, bound to the nitrogen atom)

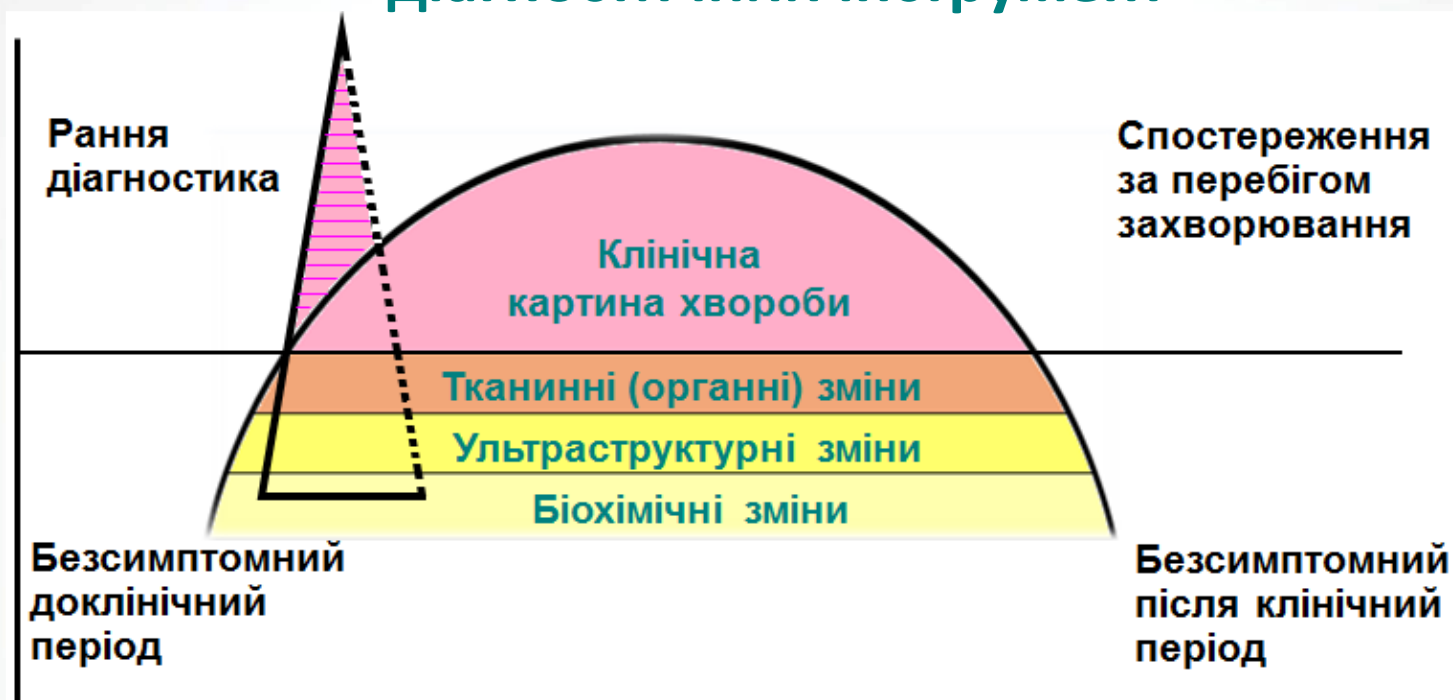


СХОР розглядається як одна з провідних причин синдрому раптової дитячої смерті



Демографічний щорічник "Населення України за 2017 рік",
Державна служба статистики України

Біохімічні маркери СХОР як діагностичний інструмент

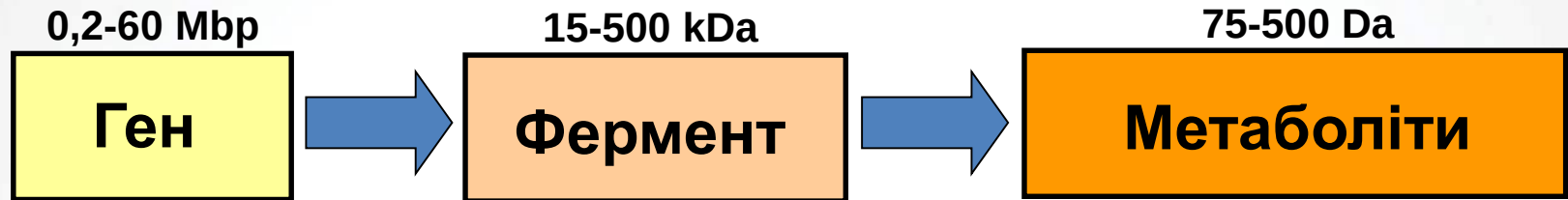


- Рання (доклінічна) верифікація патології
- Підтвердження та диференціальна діагностика клінічно маніфестних нозологічних форм
- Оцінка ефективності терапії

Аналіз біохімічного складу крові, сечі, цереброспінальної рідини та ін. дозволяє оцінити функціональний стан внутрішніх органів та метаболізм ліпідів, білків, вуглеводів та вітамінів. Цей метод широко застосовується в діагностиці спадкових хвороб обміну речовин (метаболічна генетика)

Prasad C., Galbraith P.A. Sir Archibald Garrod and alkaptonuria - 'story of metabolic genetics' // Clin. Genet. – 2005. Vol. 68, N 3.- P. 199-203.

Лабораторні методи діагностики спадкових хвороб обміну



ДНК-діагностика

Молекулярно-генетичні дослідження.
Виявлення мажорних мутацій.
Секвенування

Ензимодіагностика

Оцінка каталітичної активності ферментів, які експресовані у клітинах крові або фібробластах

Кількісні аналітичні методи

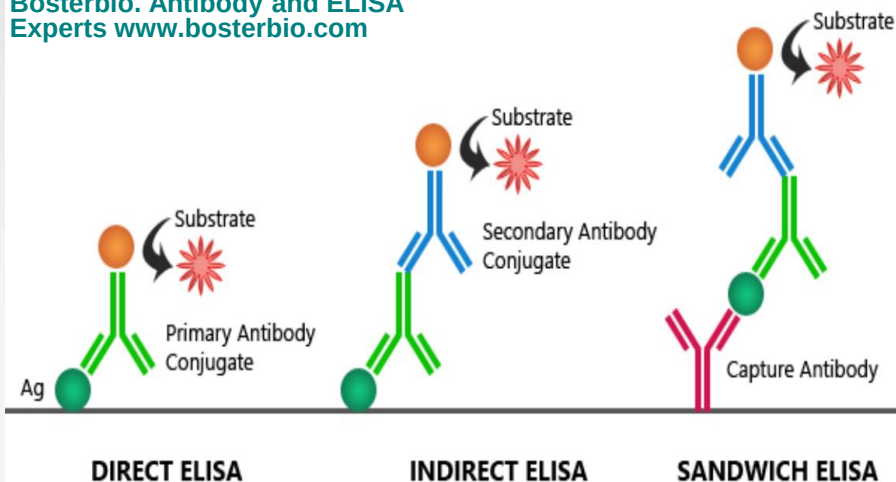
Імунофлюориметрія.
Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ).
Тандемна мас-спектрометрія (ТМС).
Газова хроматографія-мас-спектрометрія (ГХ/МС)

Загальні питання

- Продуктивність
- Чутливість
- Референтні значення
- Тривалість визначення
- Селективність
- Вартість
- Контроль якості

Імунохімічні методи виявлення маркерів СХОР

Bosterbio. Antibody and ELISA
Experts www.bosterbio.com



	Indirect	Direct	Sandwich
Capture Ab Coating	X	X	•
Antigen Coating	•	•	X
Blocking	•	•	•
Sample (Antigen) Incubation	X	X	•
Primary Ab Incubation	•	•	•
Secondary Ab Incubation	•	X	•
Substrate Prep	•	•	•
Signal Detection	•	•	•
Data Analysis	•	•	•

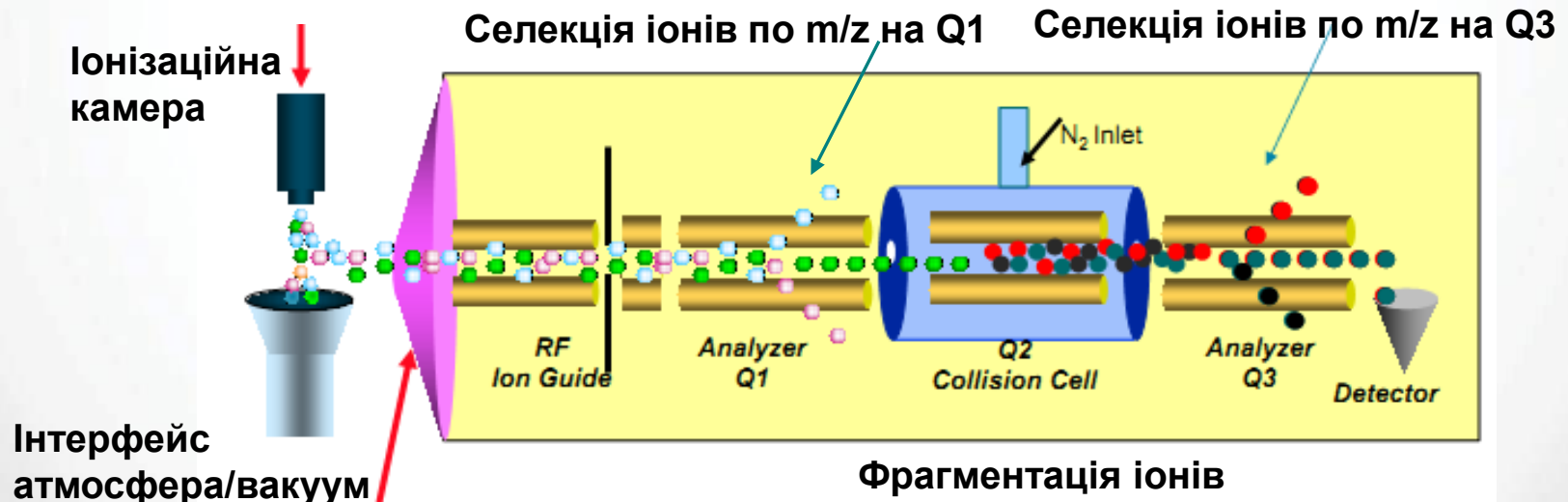


- ☹️ **Низька продуктивність (один зразок – один показник)**
- ☹️ **Проблеми специфічності (крос-реакції і накладення)**
- ☹️ **Низькі межі кількісного аналізу (досягнута межа чутливості)**
- ☹️ **Висока вартість визначення (великі трудовитрати)**
- ☹️ **Дефіцит антитіл та складний цикл розробки нових тестів**

Тандемна мас-спектрометрія

Тандемна мас-спектрометрія (ТМС) – фізико-хімічний метод кількісного визначення аналітів шляхом їх іонізації та фрагментації з наступним виміром відношення маси до заряду (m/z) цільових іонів.

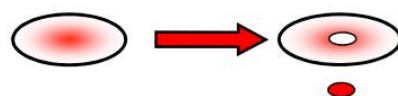
- Чутливість: 10^{-15} – 10^{-21} г/л
- Селективність – 99,999
- Аналіти: стероїди, амінокислоти і їх похідні, лікарські препарати та ін.
- Зразки: складні матриці – біологічні рідини (кров, сеча, ліквор та ін.), висушені на фільтрувальному папері плями крові.
- Час виконання аналізу: 7- 20 хвилин.
- Мультиплексність: до 1000 аналітів в одному зразку, відсутність інтерференції.
- Ідентифікація, кількісний аналіз і підтвердження одночасно.



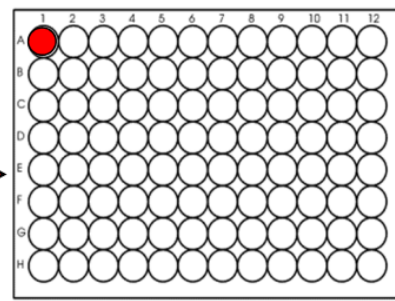
ТМС як метод виявлення маркерів СХОР



dried blood spot (DBS)



Diameter of circle 3.2 mm



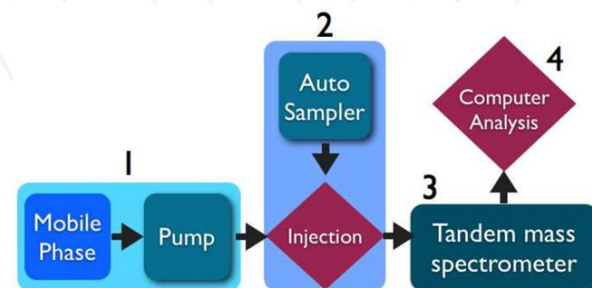
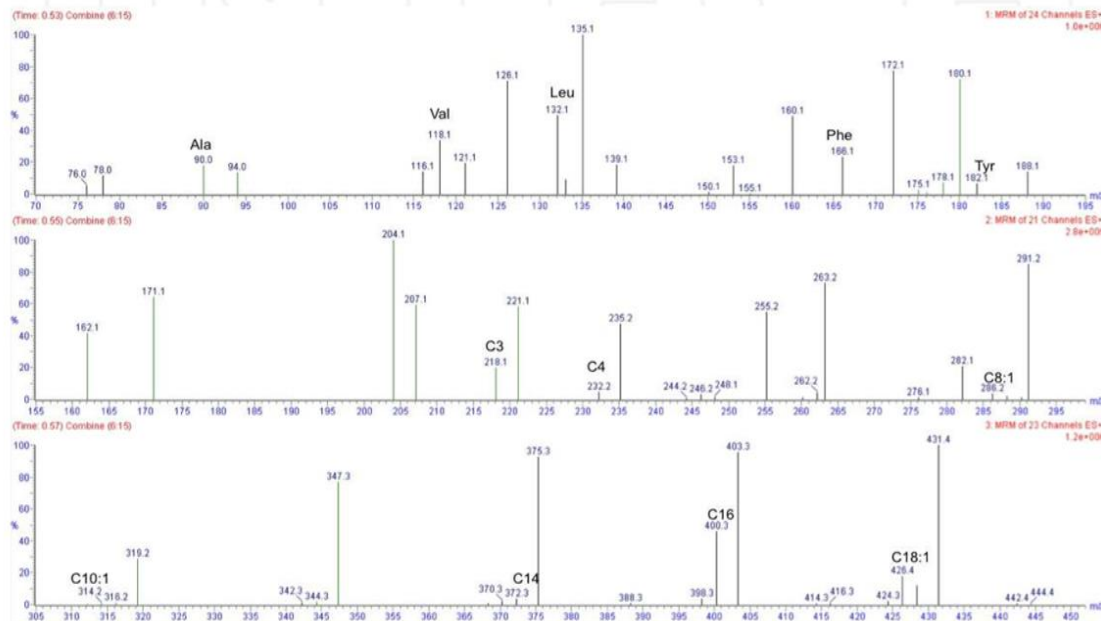
200 μ L of MeOH +
labelled internal
standards and

+ Butilation
65°C 25 min

100 μ L of hydrazine
3mmol/L,
25 min 37°C

Evaporation under nitrogen flow 55°C

ACN/Water +0.05% formic acids 70:30
Flow Injection Analysis (LC-MS/MS)





tiglylglycine

2-methyl-3-OH-butyrate

2-methyl-acetoacetate

Methylcitrate

3-OH-propionate

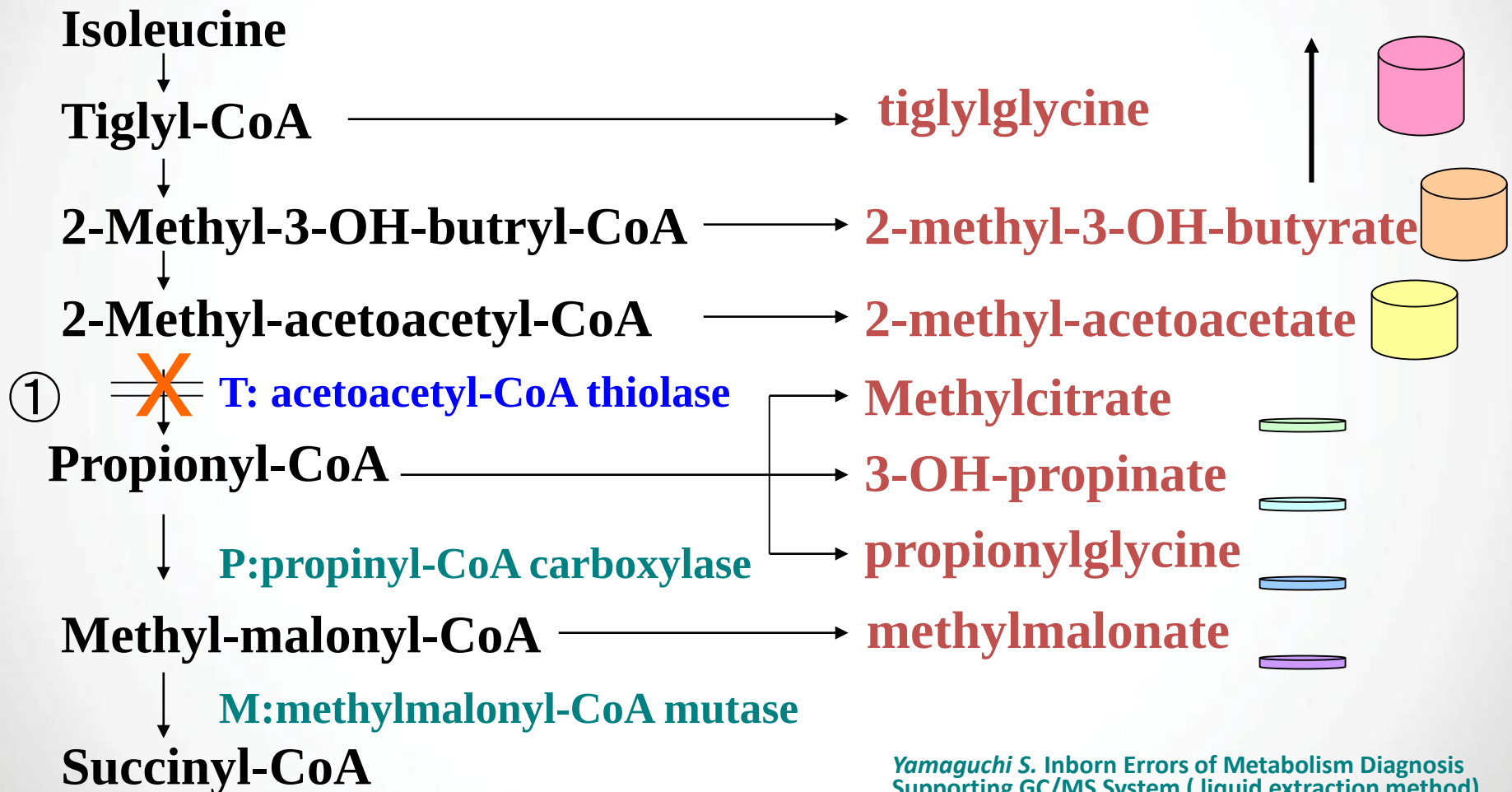
propionylglycine

methyImalonate

Succinyl-CoA

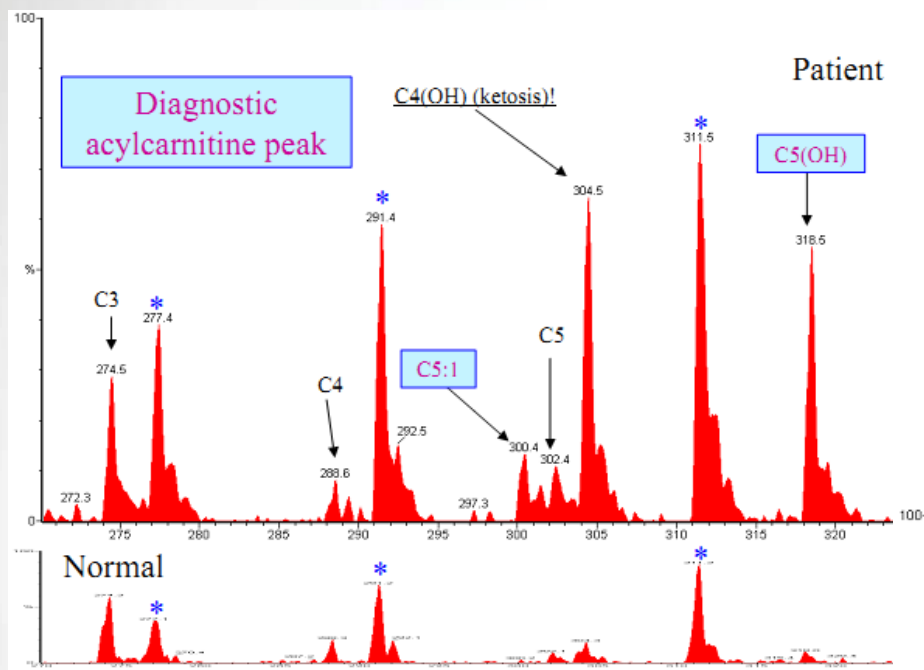
11

Профіль інтермедіатів катаболізму ізолейцину (β -ketothiolase deficiency)



Yamaguchi S. Inborn Errors of Metabolism Diagnosis
Supporting GC/MS System (liquid extraction method).
Shimadzu Group, 2005

Дефекти катаболізму ізолейцину



Дефіцит метилмалоніл мутази (ММА):
(В12-чутлива та нечутлива форми)

Профіль ацилкарнітинів у крові:

С3 пропіоніл-карнітин

В сечі накопичується:

Метилмалонова кислота

Метиллимонна кислота

3-ОН-пропіонова кислота

Дефіцит бета-кетотіолази (ВКТ):

Профіль ацилкарнітинів у крові:
С5(OH) - 2-метил-3-гідрокси-бутирил-карнітин

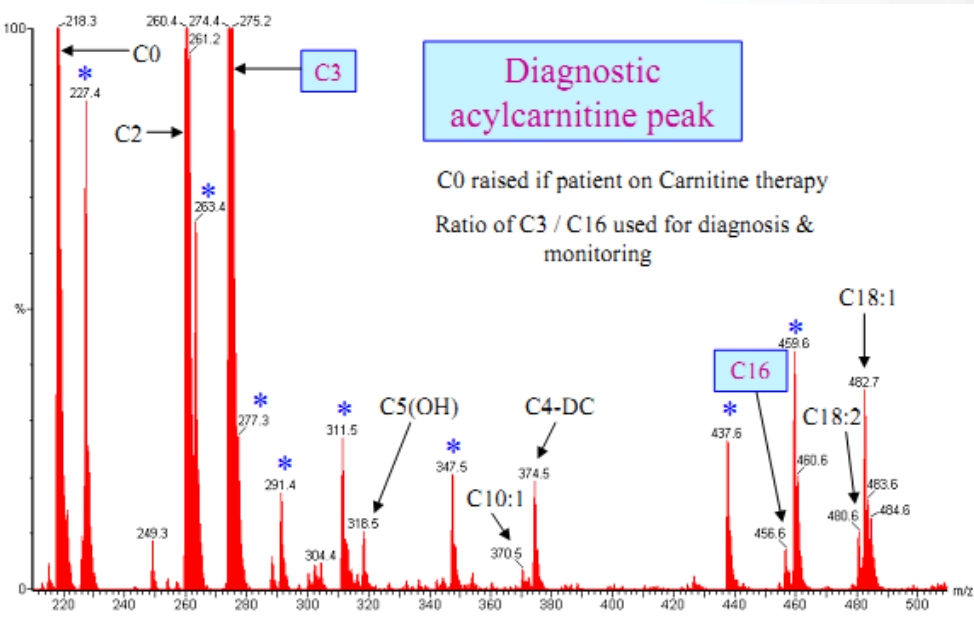
С5:1 – тигліл-карнітин

В сечі накопичується

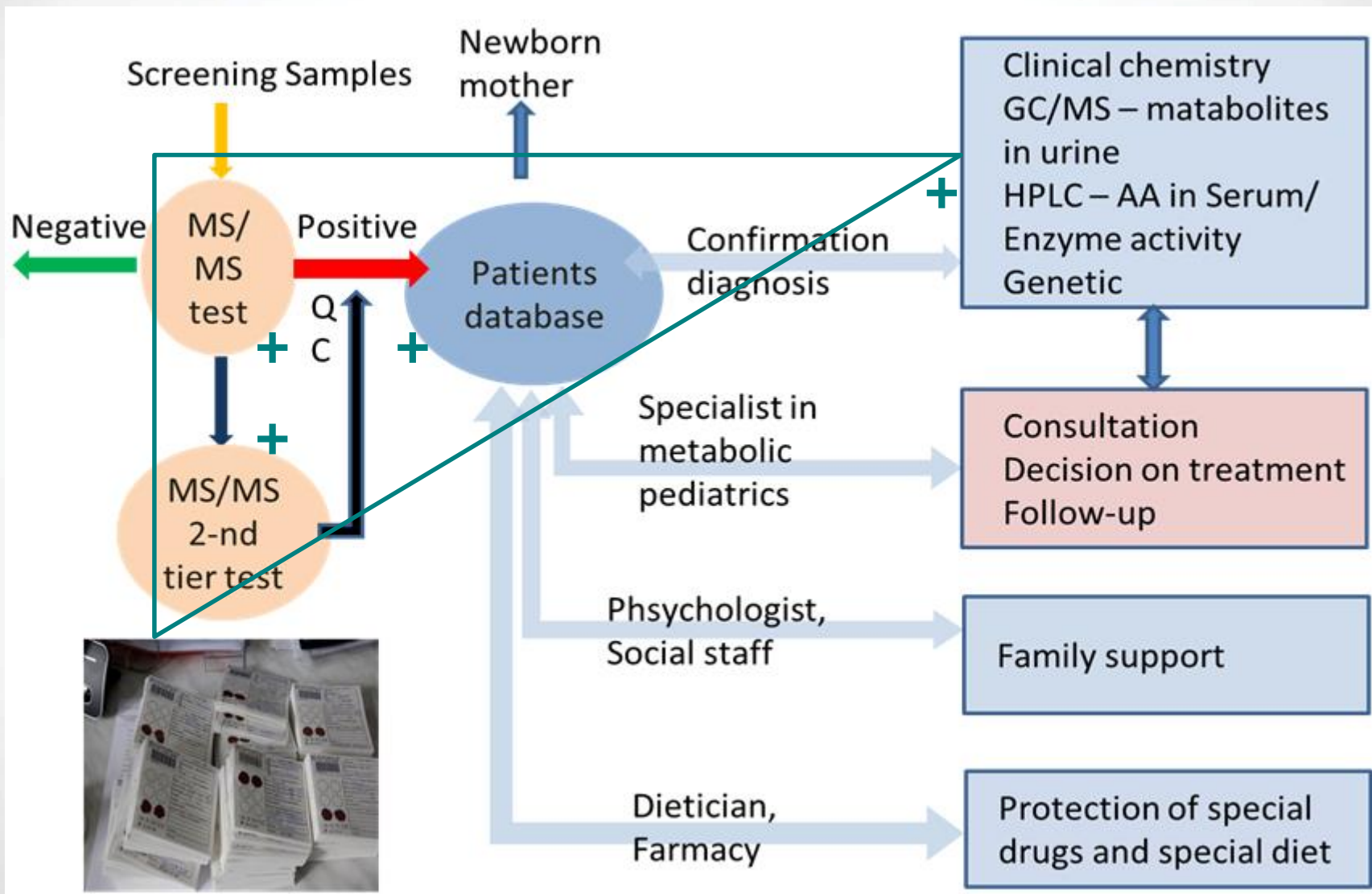
2-метил-гідроксибутират

2-метил-ацетоацетат

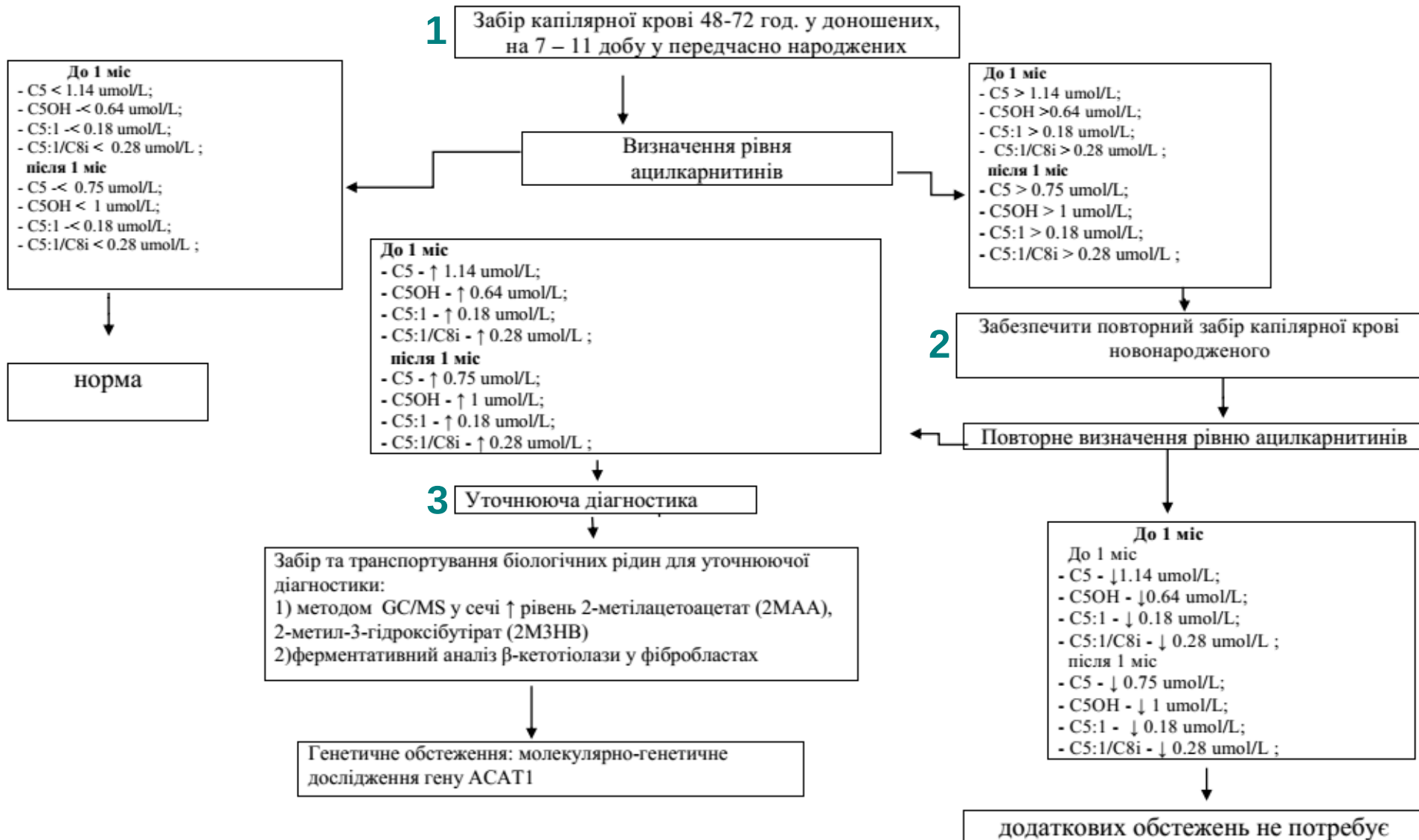
Тигліл-гліцин, Кетонові тіла



Розширений скринінг новонароджених ЯК СИСТЕМА



Діагностичний алгоритм для СХОР Дефіцит бета-кетотіолази (ВКТ)



СХОР, маркери, невідкладні дії

Захворювання	Абрев.	Маркери	Тактика ведення
Хвороба "кленового сиропу"	MSUD	Leu+Ile, Val	Негайна госпіталізація
Цитрулінемія	CYT	Cyt	Негайна госпіталізація
Аргініносукцинатна ацидемія	ASA	Cyt, Arg	Негайна госпіталізація
Пропіонова ацидемія	PA	C3, C3/C2, C3/C0,	Негайна госпіталізація
Метилмалонова ацидурія	MMA	C4DC	
Ізовалеріанова ацидемія	IVA	C5, C5/C2	Негайна госпіталізація
3-метілкротонілова ацидурія	MCC	C5OH, C6DC	Термінова метаболічна консультація, госпіталізація при значному підвищенні
Множ. дефіцит карбоксилаз	MCD		
3-гідроксі-3-метилглутарова ацидурія	HMGA		
Глутарова ацидурія типу I	GA I	C5DC	Негайна госпіталізація
Дефіцит β-кетотіолази	BKT	C5:1	Негайна госпіталізація
Недостатність CPT типу I	CPT I	C0, C0/(C16 + C18)	Негайна госпіталізація
Недостатність CPT типу II	CPT II	C16, C18, C18:1,	Негайна госпіталізація
Недостатність CACT	CACT	low C0	
Дефіцит MCAD	MCAD	C8, C8/C2, C8/C12	Негайна госпіталізація
Дефіцит VLCAD	VLCAD	C14:1, C14:2, C16	Негайна госпіталізація
Дефіцит LCHAD	LCHAD	C16OH, C18:1OH	Негайна госпіталізація

AA

OA

FAO

Гостра метаболічна декомпенсація при СХОР

Кризові метаболічні стани зазвичай виникають при значному зниженні (< 10%) нормальної активності певних ферментів, чи повної її відсутності.

Провокуються:

- навантаження білком або вуглеводами
- тривале голодування
- низька калорійність раціону
- інтеркурентні респіраторні або шлунково-кишкові захворювання
- вакцинація
- фізичне або психоемоційне навантаження
- оперативні втручання.

Перший епізод метаболічної декомпенсації часто має фатальні наслідки.

З огляду на це, **терапію слід розпочинати** при наявності «загрозливих» результатів ТМС-аналізу висушених плям крові, до появи перших симптомів в так званий «світлий проміжок», **не чекаючи результатів уточнюючих лабораторних досліджень.**

Хто не йде вперед, той іде назад*

Лікування хворих зі СХОР у стані метаболічної декомпенсації не потребує спеціальних умов і може бути проведено у звичайному відділенні інтенсивної терапії неонатологічного або педіатричного лікувального закладу

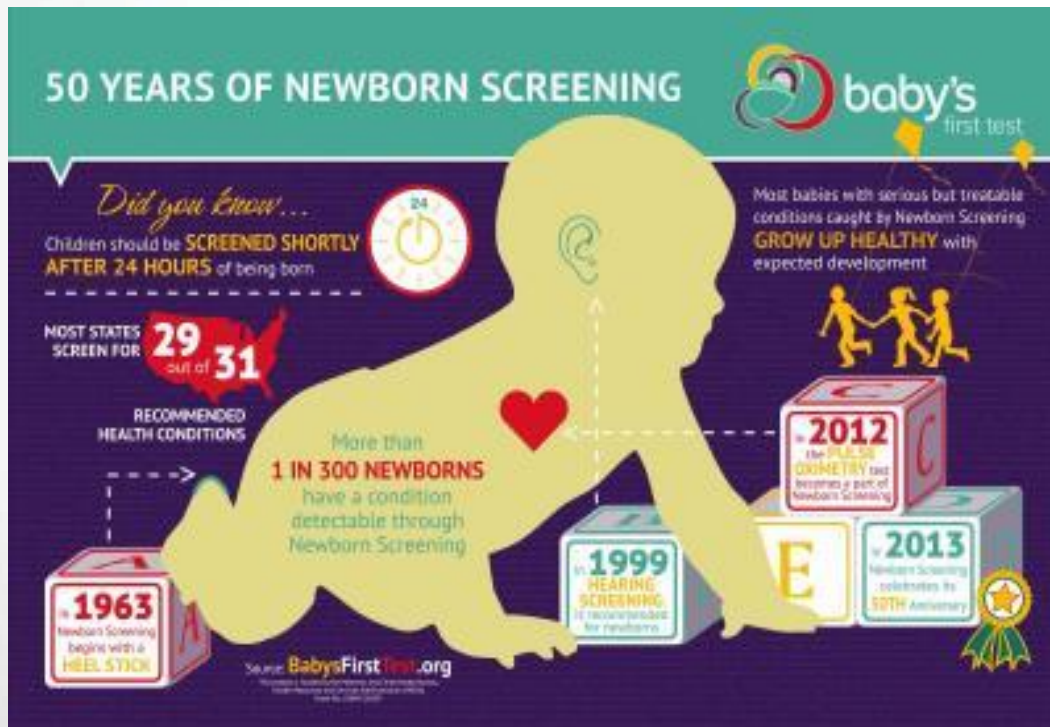


* Бєлінский В.Г.

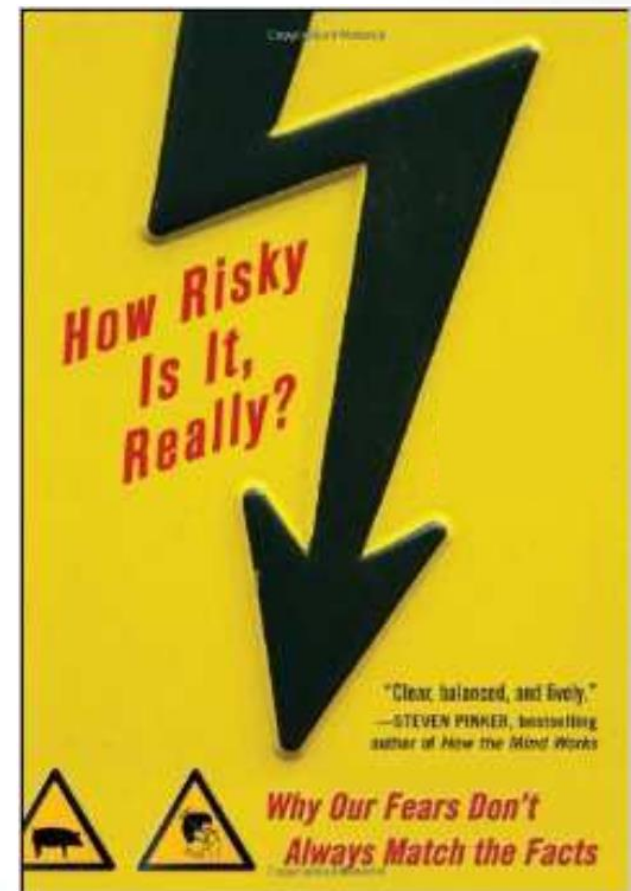
В розвинутих країнах світу скринінг новонароджених діє більше ніж 50 років.

Розширений скринінг новонароджених з використанням ТМС більше – 20 років.

В Україні це питання лише обговорюється.



<http://www.babysfirsttest.org/newborn-screening/about-newborn-screening>





*Дякую
за увагу!*

