

Stoffwechselfeldiagnostik: Tägliche Analytik organischer Säuren im Urin mittels LC-MS/MS und ggf. weiterführende Gen-Diagnostik

Medizinischer Hintergrund

Die organischen Säuren stellen eine sehr heterogene Gruppe organischer Verbindungen dar, die gemäß Definition mindestens eine Carboxylgruppe tragen und darüber hinaus eine weitere chemische Gruppe wie Keto-, Amino- oder Hydroxylgruppen. Die Länge der Kohlenstoffkette ist variabel. Zudem bestehen organische Säuren aus stickstoffhaltigen Konjugaten (Acylglycine). Allgemein handelt es sich um Metabolite aus nahezu allen Stoffwechselabläufen. Hierzu zählen Aminosäuren-Metabolite nach Desaminierung, Metabolite der Fettsäuren sowie Citratzyklus-Metabolite und Stoffwechselprodukte des Kohlenhydratkatabolismus.

Indikationen

Zu den klinischen Indikationen für eine Analyse der organischen Säuren zählen klassische bzw. cerebrale Organoazidurien, Stoffwechsellentgleisungen, metabolische Azidosen, Laktatazidurie/ Laktatazidose, Hyperammonämie, Ketonurie/Ketonämie, Hypoglykämie, Störungen des Energiestoffwechsels, Hepatopathie unklarer Ursache, Verdacht auf (hereditäre) Abbaustörungen von Fettsäuren (β -Oxidationsstörung), Störungen des Abbaus verzweigt-kettiger Aminosäuren und weitere.

Einen besonderen Stellenwert nehmen die Organoazidurien ein. Bei den klassischen Formen handelt es sich um Abbaustörungen der verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin. Je nach Funktionsverlust der beteiligten abbauenden Enzyme sind vor allem die Methylmalonazidurie, Propionazidurie, 3-Methylglutaconazidurie sowie 3-Methylcrotonylglycinurie relevant. Phänotypisch präsentieren sich klassische Organoazidurien häufig mit rezidivierend auftretender metabolischer Dekompensation mehrerer Organe. Biochemisch treten hierbei metabolische Azidosen, Laktatämie/-urie, Ketonämie/-urie, Hyperammonämie und/oder Hypoglykämie ein.

Die cerebralen Organoazidurien treten phänotypisch zumeist mit neurologischen Symptomen in Erscheinung. Entgleisungen auf metabolischer Ebene treten i.d.R. hierbei nicht auf. Der Krankheitsverlauf vollzieht sich zumeist chronisch-progredient. Im klinischen Verlauf treten je nach Defekt epileptische Anfälle, Fieberkrämpfe, psychomotorische Dysfunktionen (z.B. Ataxien), Kardiomyopathien und Neurodegeneration auf. Beispielhaft seien die Glutarazidurie Typ I, 2-Hydroxyglutarazidurie, Morbus Canavan, 2-Methyl-3-Hydroxybutyrazidurie und Ethylmalonazidurie genannt. Dem überwiegenden Teil der cerebralen Organoazidurien liegt ein gestörter Abbau des Lysins, Hydroxylysins und des Tryptophans zugrunde.

Analytik mittels LC-MS/MS optimiert die Diagnostik

Das Panel *Organische Säuren im Urin* umfasst über 60 Analyte, verteilt auf zwei Läufe mit chromatografischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion (LC-MS/MS). Die Quantifizierung erfolgt in der Einheit $\mu\text{mol/l}$ sowie bezogen auf das mitgemessene Kreatinin als mmol/mol Kreatinin.

Als Untersuchungsmaterial ist nativer Urin (Spontanurin) einzusenden. Da zusätzlich die Bestimmung des Kreatinins als rechnerische Bezugsgröße erforderlich ist, ergibt sich ein Mindestvolumen von 200 μl . Ausschlusskriterien für die Analytik sind z.Z. nicht bekannt.

Eine ausreichende Stabilität über alle Parameter ist nur bei direkter Zustellung am Tag der Urinabnahme gegeben. Ist dies logistisch nicht möglich, so muss der gewonnene Urin bis zur Analytik tiefgefroren gelagert und versandt werden.

Nach Möglichkeit sollte die Bestimmung der organischen Säuren mit der Untersuchung der Acylcarnitine im Trockenblut sowie der Aminosäuren im Plasma ergänzt werden, um eine differenzialdiagnostische Bestätigung zu erhalten. In zahlreichen Fällen ergeben sich jeweils korrespondierende Muster, welche die Aussagekraft des Befundes erhöhen und sichern.

Referenzbereiche und Beurteilung

Die Referenzbereiche sind abhängig von der jeweiligen Säure und vom Alter der Patienten. Die detaillierte Übersicht der Referenzbereiche findet sich online unter *Organische Säuren im Urin (quantitativ)* auf unserer Webseite www.mezizin-zentrum-dortmund.de

Die Beurteilung der Analyseergebnisse erfolgt in einer individuellen Befundung, die neben der Befundinterpretation der organischen Säuren ggf. weitere erfolgte Diagnostik zu Aminosäuren, Acylcarnitine und Vorbefunde berücksichtigt bzw. Empfehlungen gibt für weitere sinnvolle Stoffwechselfeldiagnostik.

In der Regel liegen Ergebnis und Beurteilung nach 1-2 Werktagen vor.

Material

Spontanurin, Versand tiefgefroren

Methode

LC-MS/MS, i. d. R. täglicher Ansatz

Abrechnung

EBM: 2x Ziffer 32314 (103,80 EUR), Kreatinin (Ziffer 32066 - 0,40 EUR)

GOÄ: 2x Ziffer 4210 (104,92 EUR), Kreatinin (Ziffer 3585H1 - 2,33 EUR)

Ansprechpartner Metabolische Spezialdiagnostik

Markus Mallek	Tel.: 0231-9572-1253
Sina Kleinert	Tel.: 0231-9572-1254
Dr. Falko Wünsche	Tel.: 0231-9572-6657

Weiterführende genetische Stoffwechsel-Diagnostik

Informationen siehe Seite 2.

Bitte wenden!

Literatur zu Stoffwechseldiagnostik mittels LC-MS/MS:

1. Hoffmann G. F. (2019) Metabolische Erkrankungen. Pädiatrie: 41-73.
2. Blau, N. et al. (2003). Physicians's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases, 2nd Edition, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
3. Rinaldo, P et al. (2006). Inborn errors of amino acids, organic acid and fatty acid metabolism. In: Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics, 4. Edition, Elsevier Saunders
4. Karall et al. (2018) Organoazidopathien. In: Duale Reihe Pädiatrie. 5., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme

Weiterführende genetische Stoffwechsel-Diagnostik

Außer der Stoffwechseldiagnostik mittels LC-MS/MS im Urin bieten wir auch Untersuchungen auf Gen- und Enzyme Ebene an.

Für mehrere Störungen im Ketonkörper-Stoffwechsel lassen sich Tests auf Enzymaktivität in Blutzellen oder in kultivierten Fibroblasten durchführen (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Lyase-Mangel (HMG-Mangel), 2-Methylacetoacetyl-CoA-Thiolase-Mangel (MAT-/T2-, beta-Ketothiolase-/3-Oxothiolase-Mangel), Succinyl-CoA:3-Oxoacyl-CoA-Transferase-Mangel (SCOT)-Mangel, Ansprechpartner Dr. Falko Wünsche 0231-9572-6657). Um einem Verdacht auf eine Stoffwechselstörung bei entsprechenden Hinweisen auf Metaboliten-Ebene nachzugehen, kann die Analyse von Einzelgenen i.d.R. durch Sanger-Sequenzierung und MLPA erfolgen. Alternativ können weiter gefasste Panels zur gleichzeitigen Untersuchung mehrerer Gene angefordert werden. Die entsprechenden NGS-Panel sind dabei unterteilt in: *Core-Panel* (Analyse der „Hauptgene“ einer Erkrankung/eines Phänotyps mit einer Abdeckung der Zielregionen von 100%, da diagnostische Lücken im NGS dieser Gene zusätzlich durch Sanger-Sequenzierung geschlossen werden) und *Erweitertes Panel* (umfangreiches Screening auch solcher Gene, die seltener ursächliche Varianten für eine bestimmte Erkrankung/einen bestimmten Phänotyp tragen; einzelne Bereiche untersuchter Gene können methodisch bedingt ggf. nicht vollständig abgedeckt sein).

Beispiele verfügbarer Einzelgen-Untersuchungen

- **Aminosäure- und Peptid-Stoffwechsel:** *ACADSB, GSS, HSD17B10, OPLAH*
- **Ketogenesedefekte:** *HMGCL, HMGCS2*
- **Ketonkörpertransportstörung:** *SLC16A1*
- **Ketolyesedefekte:** *ACAT1, OXCT1*
- **Kohlenhydrat-Stoffwechsel:** *ALDOB, FBP1, GALT*

Beispiele verfügbarer NGS-Panel

- **Glykogenosen**
Core-Panel (10 Gene): *AGL, G6PC, GAA, GBE1, PFKM, PGAM2, PHKB, PYGL, PYGM, SLC37A4*
Erweitertes Panel (13 weitere Gene): *ALDOA, ENO3, FBP1, GYG1, GYS1, GYS2, LAMP2, LDHA, PHKA1, PHKA2, PHKG2, PRKAG2, SLC2A2*
- **Harnstoffzyklusdefekte**
Core-Panel (11 Gene): *ARG1, ASL, ASS1, CPS1, GALT, MUT, NAGS, OTC, PCCA, SLC25A13, SLC25A15* - *Erweitertes Panel* (9 weitere Gene): *CA5A, FAH, GLUD1, IVD, MMAA, MMAB, OAT, PCCB, SLC7A7*
- **Ketonkörper-Stoffwechselstörung**
Panel (5 Core-Gene) *ACAT1, HMGCL, HMGCS2, OXCT1, SLC16A1*
- **Ketonkörper-Stoffwechsel/Glykogenspeicherkrankheiten & weitere**
Panel (51 Gene): *ACAA2, ACADM, ACADSB, ACADVL, ACAT1, ACAT2, AGL, ALDOA, ALDOB, BDH1, ENO3, FBP1, G6PC, G6PC2, G6PC3, GAA, GALT, GBE1, GSS, GYG1, GYS1, GYS2, HMGCL, HMGCS1, HMGCS2, HSD17B10, IVD, LAMP2, LDHA, OPLAH, OXCT1, OXCT2, PC, PCCA, PCCB, PCK1, PFKM, PGAM2, PHKA1, PHKA2, PHKB, PHKG2, PRKAG2, PYGL, PYGM, SLC16A1, SLC16A6, SLC25A13, SLC2A1, SLC2A2, SLC37A4*

Beurteilung

Die Mitteilung der Ergebnisse erfolgt in Form eines detaillierten Befundberichtes. Die pathogenetische Relevanz von Sequenzvarianten erfolgt nach den international anerkannten ACMG-Kriterien und berücksichtigt die aktuelle Literatur sowie die verfügbaren Variantendatenbanken. Berichtet werden Varianten unklarer Signifikanz, wahrscheinlich pathogene und pathogene Varianten. Es erfolgt eine individuelle Befundung, welche die klinische Symptomatik und die Vorbefunde der biochemischen Stoffwechseldiagnostik berücksichtigt. Die Dauer der Untersuchung (2-8 Wochen) ist abhängig vom Umfang der Analytik (z. B. Einzelgen-Analytik vs. NGS-Panel Diagnostik) und dem Rechercheaufwand.

Material

2 ml EDTA-Blut, Versand bei Umgebungstemperatur
Es ist das Gendiagnostikgesetz (GenDG) zu beachten. Für genetische Analysen muss eine **Einwilligungserklärung** des Patienten vorliegen. Hinweise zur Anforderung von genetischen Analysen sind auf unserer Webseite www.medizin-zentrum-dortmund.de unter *Humangenetik* zu finden.

Methode

Sanger-Sequenzierung, MLPA, Next-Generation-Sequencing (NGS)
Details zu Einzelgen- und NGS-Panel-Analysen siehe online unter www.medizin-zentrum-dortmund.de in unserem Untersuchungsprogramm unter *Molekulargenetik* (Analysen A-Z (Einzelgen-Analysen) sowie unter *Next Generation Sequencing / NGS-Panel-Diagnostik*). Bei Bedarf kann die Zusammenstellung der Gene in einem NGS-Panel auf die individuelle Fragestellung angepasst werden (Exom-basierte Panelanalytik).

Abrechnung

EBM: Ziffern 11301, 11302, 11512, 11513 (Anzahl abhängig von der Größe des Gens bzw. Panels)

GOÄ: Ziffern 80, 3920, 3922, 3924, 3926 (Anzahl abhängig von der Größe des Gens bzw. Panels)

Ansprechpartner genetische Diagnostik

Dr. Raina Yamamoto Tel.: 0231-9572-6666 (Molekulargenetik)

Die Befundung erfolgt in Kooperation mit Prof. Dr. Jörn Oliver Sass, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Tel.: 01575-2046553.