

DOSAGE DES ACYLGLYCINES URINAIRES PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE EN TANDEM (RÉFÉRENCE – 2014.03.09)

Avis d'évaluation

1 INFORMATION GÉNÉRALE

- 1.1 **Demandeur** : Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS)
- 1.2 **Date de transmission de l'avis au ministre** : 23 décembre 2015
- 1.3 **Date de publication de l'avis** : 22 février 2016

Mise en garde

Le présent avis est fondé sur l'information déposée par le demandeur ainsi que sur une recherche documentaire complémentaire selon les données disponibles au moment de l'évaluation de l'analyse par l'INESSS.

2 ANALYSE ET TECHNIQUE ÉVALUÉE

2.1 Nom de l'analyse

Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) utilisant la méthode de dilution à l'isotope stable.

2.2 Description brève de l'analyse et précisions techniques et cliniques

La technique comporte trois étapes : 1) la préparation de l'échantillon, 2) la chromatographie en phase liquide (LC) et 3) l'analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

La préparation de l'échantillon est faite par une méthode de dilution à l'isotope stable suivie d'une dérivation chimique. Elle consiste à diluer l'échantillon avec une solution contenant des isotopes d'acylglycines. La quantité d'analytes dans l'échantillon est déterminée selon le ratio obtenu avec les isotopes. Cette méthode est utilisée pour l'analyse des petites molécules et des marqueurs protéiniques [Ciccimaro et Blair, 2010].

La LC permet de séparer les molécules d'un mélange complexe (urine, plasma ou autre fluide) selon leurs propriétés physicochimiques (poids moléculaire, hydrophobicité ou autre). Le principe de la LC fait intervenir une phase liquide mobile et une phase solide stationnaire. La composition des phases liquide et solide varie en fonction du type de molécule à purifier.

La spectrométrie de masse vise à déterminer la masse des molécules présentes dans un échantillon donné. La mesure de la masse repose sur la déviation des molécules préalablement ionisées par un champ électrique ou magnétique, pour lesquelles les trajectoires sont proportionnelles à leur masse et à leur charge.

Le spectromètre de masse est composé :

1. d'une source d'ionisation pour modifier la charge des molécules et les faire passer en phase gazeuse (ionisation par électronébuliseur);
2. d'un analyseur qui permet de séparer les ions en fonction du rapport de la masse sur la charge (m/z).

Les analyseurs peuvent être couplés de façon séquentielle. Il s'agit de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions (dans le cas présent, en tandem, donc MS/MS). Un premier analyseur sélectionne les ions selon un rapport m/z (purification). L'ion purifié est ensuite fragmenté dans une chambre de collision. Un deuxième analyseur mesure le rapport m/z des fragments [Grebe et Singh, 2011].

En résumé, le dosage des acylglycines urinaires est effectué par la dilution isotopique de l'urine suivie d'une dérivation butylique. Les extraits sont ensuite injectés dans un système LC-MS/MS d'Agilent (Agilent Technologies). La chromatographie est effectuée sur une colonne de type C18. Le traitement des résultats d'analyse est effectué avec le logiciel MassHunter (Agilent Technologies).

2.3 Modalités d'administration du test

Si le demandeur est désigné pour la présente analyse, les modalités seraient les suivantes : une miction urinaire congelée d'au moins 1 ml serait expédiée directement au laboratoire de génétique biochimique du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke (CHUS) par le laboratoire du centre demandeur (au Québec ou hors Québec). Dès la réception de l'échantillon au laboratoire du CHUS, le processus de traitement serait entamé : réception, inscription au système, analyse, quantification, interprétation, validation et transmission du résultat au médecin demandeur. Le temps de réponse serait de 5 jours ouvrables. L'analyse sera réalisée une fois par semaine. Si le contexte clinique l'exige, il sera possible de réaliser l'analyse dans un plus court délai, soit 24 heures après la réception de l'échantillon.

2.4 Société ou développeur

Il s'agit d'une analyse maison avec un profil de 21 acylglycines (voir l'annexe B pour la liste des acylglycines).

2.5 Statut d'homologation (Santé Canada, FDA)

Ne s'applique pas.

2.6 Valeur pondérée : 115,0

3 CONTEXTE

3.1 Patients ciblés

Les patients ciblés sont les nouveau-nés chez qui l'on suspecte une erreur innée du métabolisme (EIM) ou les patients ayant des symptômes de maladies métaboliques héréditaires.

3.2 Description de la maladie visée

Plusieurs EIM sont visées par la présente analyse, y compris, notamment, le déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne (*medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency*, MCADD), le déficit en bêta-cétothiolase, l'acidémie glutarique de type II, le déficit multiple en carboxylases, l'encéphalopathie éthylmalonique et l'acidémie isovalérique.

Le MCADD est une maladie autosomique récessive de l'oxydation mitochondriale des acides gras, qui se manifeste généralement par une hypoglycémie hypocétosique, une léthargie ou des vomissements provoqués par un stress catabolique. Pendant les épisodes aigus, le MCADD peut également entraîner des crises d'épilepsie, une hépatomégalie et, dans certains cas, un coma ou le décès. Une fois le diagnostic établi, le pronostic est excellent dans la mesure où les périodes de jeûne sont évitées [Matern et Rinaldo, 2015; ACMG, 2012a].

Le déficit en bêta-cétothiolase est un défaut de l'acétoacétyl-CoA thiolase mitochondriale qui se manifeste par une perte progressive des aptitudes cognitives et motrices entraînant parfois une léthargie et un coma lors des épisodes acidocétosiques sévères. Les conséquences cliniques peuvent être évitées par un diagnostic précoce, la prise en charge de l'acidocétose et un régime restreint en protéines. Le pronostic de cette maladie est généralement bon [Fukao, 2004].

L'acidémie glutarique de type II (*multiple acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency*, MADD) sévère se manifeste par un coma acidotique sans cétose combiné à une hypoglycémie, une hyperammoniémie, une hypotonie et une myocardiopathie qui sont parfois associés à des malformations congénitales [Saudubray, 2004].

Le déficit multiple en carboxylases inclut les anomalies héréditaires du métabolisme de la biotine, qui se manifestent par une grande variété de symptômes [Wolf, 2011].

L'encéphalopathie éthylmalonique se manifeste par une acrocyanose orthostatique et une diarrhée chronique associées à un retard de développement, une régression psychomotrice, une hypotonie et des anomalies visibles à l'imagerie par résonance magnétique. Le pronostic est généralement mauvais [Gregersen, 2007].

L'acidémie isovalérique est une maladie autosomique récessive qui se manifeste par des vomissements, une déshydratation, un coma et des mouvements anormaux [Orphanet, 2005].

Au Canada, la prévalence du MCADD uniquement est estimée à 6 cas sur 100 000 naissances [AETMIS, 2007]. Les autres EIM ciblées par la présente analyse sont en général plus rares. En fait, l'incidence combinée de ces maladies est estimée à 1 nouveau-né sur 1 500 [Raghuveer *et al.*, 2006] et à 1 cas sur 4 000 [INESSS, 2013].

Les acylglycines sont des molécules formées par la conjugaison d'un acide aminé, la glycine, et d'un acyl-CoA particulier. Les acyl-CoA sont des intermédiaires normaux dans les voies métaboliques des acides organiques et des acides gras. Si le métabolisme d'un acyl-CoA est bloqué en raison d'un déficit enzymatique, la conjugaison avec la glycine facilite l'excrétion du métabolite en excès⁴. Ainsi, l'accumulation des acylglycines dans l'urine (et dans le plasma) permet leur quantification comme biomarqueurs pour la détection ou la confirmation biochimique de plusieurs EIM (annexe A) [Ombrone *et al.*, 2011].

3.3 Nombre d'analyses anticipées et de patients visés

Le volume provincial attendu sera lié au nombre de patients nouveau-nés au Québec orientés vers cette analyse après un dépistage sanguin et urinaire. En 2013, 27 cas de MCADD dépistés ont été dirigés vers le demandeur⁵. Le nombre de maladies décelées par le dépistage sanguin et urinaire chez les nouveau-nés québécois devrait s'accroître au cours des prochaines années. Il inclura des acidémies organiques et des maladies de bêta-oxydation des acides gras [INESSS, 2013].

Le demandeur estime donc le volume provincial à 100 analyses pour 2015, avec une augmentation graduelle durant les années suivantes. Ce test pourrait également être offert aux autres provinces canadiennes, puisqu'il ne serait pas encore disponible en clinique ailleurs au Canada⁶.

3.4 Spécialités médicales concernées

Pédiatrie, génétique, neurologie, biochimie médicale

3.5 Données médico-administratives

Au cours des deux dernières années, 22 analyses d'acylglycines urinaires ont été transmises au Mayo Medical Laboratories (tableau 1).

Tableau 1 Analyses d'acylglycines urinaires réalisées hors Québec entre 2012 et 2014

ANNÉE	VOLUME ANNUEL	COÛT	MONTANT GLOBAL
2012-2013	11	Entre 460,20 \$ et 474,50 \$	5 134 \$
2013-2014	11	Entre 460,20 \$ et 474,50 \$	5 134 \$

3.6 Brève description de la situation actuelle

L'analyse des acylglycines urinaires est actuellement réalisée hors Québec. Les prélèvements sont transmis au Mayo Medical Laboratories aux États-Unis, qui utilisent la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Toutefois, cette méthode comporte certaines limites sur le plan analytique, dont la sensibilité [Ombrone *et al.*, 2011], en plus d'être laborieuse et de prendre du temps [Fong *et al.*, 2012; Stanislaus *et al.*, 2012].

3.7 Brève description des avantages évoqués de l'analyse proposée

Le demandeur mentionne que l'analyse des acylglycines urinaires est considérée comme complémentaire aux analyses des acides organiques urinaires et des acylcarnitines sériques.

4. Information tirée du protocole du CHUS, PRG-8200-ACGUR-01-A.

5. Information fournie par le demandeur.

6. Information fournie par le demandeur.

Bien que certains acylglycines puissent être décelés dans le contexte de l'analyse des acides organiques urinaires (code de l'analyse : 50415) par la GC-MS, de telles méthodes ont des limites significatives sur le plan analytique. Des méthodes récemment publiées, utilisant la LC-MS/MS, ont surmonté ces difficultés et ont aussi permis d'identifier et de doser d'autres acylglycines qui étaient auparavant non détectables. La méthode proposée tient compte de ces nouvelles approches et elle inclut certains acylglycines récemment reconnus (p. ex. la crotonylglycine), et ce, dans le but d'accroître la sensibilité et la spécificité diagnostique du profil⁷.

Par ailleurs, du fait que la LC-MS/MS permette l'identification et le dosage de certains acylglycines qui étaient auparavant indétectables, cela rend possible, notamment, la différenciation d'isomères d'acylglycines [Fong *et al.*, 2012; Ombrone *et al.*, 2011; Lewis-Stanislaus et Li, 2010]. L'analyse permet de détecter plusieurs métabolites en un seul test [Lehotay *et al.*, 2011]. De plus, cette méthode est sensible, spécifique et elle ne requiert qu'un entretien minimal de l'équipement [Ombrone *et al.*, 2011].

3.8 Assurance qualité

Les contrôles internes maison seront préparés à partir d'échantillons urinaires de donneurs sains dans lesquels seront ajoutés des acylglycines à des concentrations normales et anormales et des échantillons urinaires de cas confirmés pour les maladies ciblées.

La reproductibilité et la précision de l'analyse seront évaluées pour chaque série d'analyses en comparant les valeurs obtenues pour ces contrôles avec leurs valeurs cibles et les écarts acceptables prédéterminés.

À la connaissance du demandeur, il n'existe pas de programme externe de contrôle de la qualité applicable à cette analyse. Le dosage des acylglycines urinaires est une analyse surspécialisée, et très peu de laboratoires dans le monde sont en mesure de la réaliser. Cependant, pour combler cette lacune, le demandeur envisage d'effectuer périodiquement des échanges de contrôles avec des laboratoires afin de valider les résultats obtenus.

3.9 Remplacement d'un autre test

Cette analyse ne remplace aucune analyse inscrite au *Répertoire*. Elle serait complémentaire aux analyses des acides organiques urinaires (code 50415) et des acylcarnitines sériques (code 50417).

4 DONNÉES PROBANTES

Trois études ont rapporté la valeur diagnostique et la validité analytique d'analyses des acylglycines urinaires par la LC-MS/MS ou ses variantes [Fong *et al.*, 2012; Stanislaus *et al.*, 2012; Ombrone *et al.*, 2011]. Les caractéristiques de ces études sont présentées dans le tableau 2.

7. Information fournie par le demandeur.

Tableau 2 Caractéristiques des études retenues portant sur l'analyse des acylglycines urinaires par la LC-MS/MS ou ses variantes et comparaison avec le centre demandeur

ÉTUDE (PAYS)	MÉTHODE						ANALYSE			
	CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE		SPECTROMÉTRIE DE MASSE				CONTRÔLE INTERNE	ACYLGLYCINES DÉTECTÉS*	SUJETS SAINS (ÂGE)	CAS CLINIQUES
	SYSTÈME	COLONNE	SYSTÈME	SOURCE IONISATION	MODE MRM	LOGICIEL				
Ombrone <i>et al.</i> , 2011 (Italie)	HPLC 1100 series (Agilent Technologies)	XTerra RP18 (Waters)	Triple-Quadrupole Mass Spectrometer (API 4000, Applied Biosystems, MDS Sciex)	Turbolon- Spray ionisation	Ion négatif	Analyst software version 1.4.1 (Applied Biosystems, Sciex)	Acylglycines deutérés	19	120 (< 10 ans)	13
Fong <i>et al.</i> , 2012 (Chine)	HPLC 1200 series (Agilent Technologies)	Atlantis dC18 (Waters)	Quadrupole mass Spectrometer (3200 QTRAP®, Applied Biosystems)	Turbolon- Spray ionisation	Ion positif	Analyst software version 1.4 (Applied Biosystems)	Acylglycines deutérés	9	204 (< 18 ans)	2
Stanislaus <i>et al.</i> , 2012 (Canada)	1290 Series LC (Agilent Technologies)	Kinetex® C ₁₈ (Phenomenex)	Hybrid Triple- Quadrupole Linear Ion trap Mass Spectrometer (4000 QTRAP® Applied Biosystems, MDS Sciex)	Ionisation par électronébu- liseur	Ion positif	Analyst software version 1.5 (Applied Biosystems)	Contrôles internes étiquetés d'isotopes stables	18	20 (3 échantillons par sujet) (25-35 ans)	0
CHUS – centre demandeur (Canada)	HPLC 1200 series (Agilent Technologies)	Acquity UPLC CSH C18 (Waters)	Triple Quadrupole LC- MS avec iFunnel Technology (Agilent 6490, Agilent Technologies)	Ionisation par électronébu- liseur	Ion positif	MassHunter (Agilent Technologies)	Acylglycines deutérés	21	-	-

Sigles et acronymes : CHUS : Centre hospitalier de Sherbrooke (demandeur); HPLC-MS/MS : chromatographie liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem; MRM : de l'anglais - *multiple reaction monitoring*; UPLC-MS : chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à une spectrométrie de masse

* Voir l'annexe B pour la liste des acylglycines détectés dans les trois études retenues ainsi que par le CHUS (demandeur).

4.1 Valeur diagnostique

Détection d'isomères des acylglycines

La LC-MS/MS a permis de détecter et de différencier certains isomères d'acylglycines qui pourraient être importants pour le diagnostic de cas cliniques d'EIM [Fong *et al.*, 2012; Ombrone *et al.*, 2011]. Ainsi, Ombrone et ses collègues [2011] ont différencié le butyrylglycine et l'isobutyrylglycine, en plus de distinguer le 2-methylbutyrylglycine, l'isovaleryl-glycine et le valeryl-glycine en se basant sur le temps de rétention distinct de ces acylglycines lors de la séparation chromatographique.

Détection d'acylglycines urinaires provenant d'échantillons de cas cliniques

Fong et ses collègues [2012] ont analysé des échantillons provenant de deux cas cliniques d'acidurie organique préalablement diagnostiqués. Le premier cas était un patient souffrant d'un déficit de l'holocarboxylase synthétase (une forme de déficit multiple en carboxylases). L'analyse d'un échantillon urinaire collecté pendant la phase aiguë a montré des niveaux très élevés de propionylglycine et de tiglylglycine ainsi que des niveaux élevés d'isobutyrylglycine, de butyrylglycine, d'isovaleryl-glycine et de 2-methylbutyrylglycine. L'analyse des acides organiques urinaires de deux échantillons prélevés respectivement une semaine et deux semaines après le début d'une thérapie à la biotine a montré un profil normal, alors que les concentrations de deux acylglycines (propionylglycine et tiglylglycine) sont demeurées légèrement élevées. Le deuxième cas était un patient atteint du déficit du bêta-cétothiolase. L'analyse des acylglycines d'un échantillon collecté durant la supplémentation à la carnitine a permis de révéler l'augmentation d'un acylglycine (tiglylglycine).

Ombrone et ses collègues [2011] ont analysé des échantillons provenant de 13 cas cliniques d'acidurie organique ou de désordres de la bêta oxydation des acides gras préalablement diagnostiqués :

- trois patients atteints d'acidémie propionique ont montré des concentrations de propionylglycine et de tiglylglycine excédant largement les intervalles de référence;
- un patient atteint d'acidémie isovalérique a montré une concentration élevée d'isovaleryl-glycine;
- deux patients atteints du déficit de bêta-cétothiolase ont montré une concentration élevée de tiglylglycine;
- un patient atteint de déficit en acides aminés à courte chaîne (*short branched chain amino acid deficiency*, SBCAD) a montré un niveau faible de 2-methylbutyrylglycine qui a augmenté durant une décompensation métabolique;
- quatre patients atteints de MCADD ont montré une concentration élevée d'hexanoylglycine, de phenylpropionylglycine et de suberyl-glycine;
- un patient atteint d'un déficit en acyl-CoA déshydrogénase multiple (MADD) a montré une concentration élevée d'isobutyrylglycine, de 2-methylbutyrylglycine, d'isovaleryl-glycine, d'hexanoylglycine et de suberyl-glycine; et
- un nouveau-né asymptomatique avec un C4-carnitine élevé au dépistage néonatal a montré une concentration élevée d'isobutyrylglycine, confirmant ainsi le diagnostic de déficit en isobutyryl-CoA déshydrogénase.

4.2 Validité analytique

Linéarité et recouvrement

Les méthodes utilisées dans les trois études retenues ont indiqué des coefficients de corrélation des courbes de calibration supérieurs à 0,99 [Fong *et al.*, 2012; Stanislaus *et al.*, 2012; Ombrone *et al.*, 2011]. Le recouvrement variait entre 90 % et 124 % selon les différents acylglycines analysés [Fong *et al.*, 2012; Ombrone *et al.*, 2011] (tableau 3). Aucune interférence n'a été observée dans l'étude de Stanislaus et ses collègues [2012].

Sensibilité analytique

La limite de détection et la limite inférieure de quantification varient selon le type d'acylglycines détectés par la LC-MS/MS. Les valeurs de limite de détection sont situées entre 0,001 et 0,125 μM et celles de limite inférieure de quantification entre 0,001 et 0,700 μM (tableau 3) [Fong *et al.*, 2012; Stanislaus *et al.*, 2012; Ombrone *et al.*, 2011].

Précision

Le tableau 4 présente brièvement les différentes analyses effectuées pour évaluer la précision de détection des acylglycines urinaires par la LC-MS/MS et ses variantes. Les coefficients de variabilité sont inférieurs à 10 % dans deux études [Fong *et al.*, 2012; Ombrone *et al.*, 2011] et inférieurs à 15 % dans une troisième [Stanislaus *et al.*, 2012].

Reproductibilité

Stanislaus et ses collègues [2012] ont évalué la reproductibilité de la méthode de dérivation. Les valeurs de coefficient de variabilité étaient inférieures à 10 %, à l'exception de celles de l'heptanoylglycine et de l'octonoylglycine pour lesquelles les concentrations étaient égales ou inférieures aux limites inférieures de quantification. Ces valeurs demeuraient néanmoins inférieures à 15 % [Stanislaus *et al.*, 2012].

Exactitude

Dans l'étude de Fong et ses collègues, le niveau d'exactitude, évalué à des concentrations normales et élevées, était à l'intérieur du seuil de $\pm 10\%$ des valeurs attendues [Fong *et al.*, 2012]. Dans l'étude de Stanislaus et ses collègues, le niveau d'exactitude a été évalué à des concentrations de 10 nM, 150 nM et 400 nM. Les valeurs des erreurs relatives et des coefficients de variation étaient inférieures à 15 % (tableau 5) [Stanislaus *et al.*, 2012].

Stabilité

Diverses conditions ont été appliquées pour évaluer la stabilité des acylglycines urinaires. Ces derniers sont stables dans les échantillons urinaires suivant ces conditions : 5 heures à température ambiante, 24 heures à 4 °C et 8 semaines à - 20 °C ainsi que pour 3 cycles de gel-dégel [Stanislaus *et al.*, 2012]. Par ailleurs, Fong et ses collègues ont rapporté que les acylglycines demeuraient stables dans les échantillons urinaires pour une période allant jusqu'à 3 mois à une température de - 20 °C [Fong *et al.*, 2012].

Tableau 3 La linéarité, le recouvrement et la sensibilité des analyses d'acylglycines urinaires par la LC-MS/MS et ses variantes

ÉTUDE (MÉTHODE)	LINÉARITÉ		RECOUVREMENT (% CV)	LOD (μ M)	LLOQ (μ M)
	CONCENTRATION D'ACYLGLYCINES (μ M)	COEFFICIENT DE CORRÉLATION (R^2)			
Ombrone <i>et al.</i> , 2011 (LC-MS/MS)	0,05 – 5	0,9967 – 0,9987	92 – 124	0,008 – 0,125	0,062 – 0,700
Fong <i>et al.</i> , 2012 (HPLC-MS/MS)	1 – 100	0,9913 – 0,9994	90,2 – 109,3 (1,98 – 13,58)	0,0003 – 0,0045	0,001 – 0,015
Stanislaus <i>et al.</i> , 2012 (UPLC-MS)	0,001 – 1	0,9983 – 0,9997	-	0,001 – 0,002	0,002 – 0,005

Sigles et acronymes : CV : coefficient de variation; HPLC-MS/MS : chromatographie liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LLOQ : limite inférieure de la quantification; LOD : limite de la détection; μ M : micromolaire; UPLC-MS : chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à une spectrométrie de masse.

Tableau 4 La précision des analyses d'acylglycines urinaires par la LC-MS/MS et ses variantes

ÉTUDE (MÉTHODE)	DESCRIPTION DES ANALYSES DE PRÉCISION	PRÉCISION	
		INTRAESSAI CV (%)	INTERESSAI CV (%)
Ombrone <i>et al.</i> , 2011 (LC-MS/MS)	Intraessai : 1 spécimen, 5 analyses durant le même jour Interessai : 1 spécimen, 5 préparations sur 5 jours	0,94 – 9,90	3,38 – 9,88
Fong <i>et al.</i> , 2012 (HPLC-MS/MS)	Intraessai : 20 fois dans une analyse Interessai : 1 fois par jour durant 20 jours	2,30 – 9,59	3,25 – 9,63
Stanislaus <i>et al.</i> , 2012 (UPLC-MS)	Intrajour : 1 spécimen, 10 analyses durant le même jour Interjour : 1 spécimen, 3 préparations sur 3 jours	2,5 – 11,4 (intrajour)	3,11 – 11,7 (interjour)

Sigles et acronymes : CV : coefficient de variation; HPLC-MS/MS : chromatographie liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem; UPLC-MS : chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à une spectrométrie de masse.

Tableau 5 L'exactitude des analyses d'acylglycines urinaires par la LC-MS/MS et ses variantes

ÉTUDE (MÉTHODE)	CONCENTRATION	EXACTITUDE (%)
Fong <i>et al.</i> , 2012 (HPLC-MS/MS)	normale	90,4 – 109,0*
	élevée	90,8 – 108,4*
Stanislaus <i>et al.</i> , 2012 (UPLC-MS)	10 nM	CV : 2,03 – 12,67 ER : - 5,10 – 8,52
	150 nM	CV : 0,35 – 13,55 ER : - 9,08 – 3,58
	400 nM	CV : 1,92 – 12,96 ER : - 14,87 – 1,78

Sigles et acronymes : CV : coefficient de variation; ER : erreur relative; HPLC-MS/MS : chromatographie liquide à haute performance couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LC-MS/MS : chromatographie liquide couplée à une spectrométrie de masse en tandem; LLOQ : limite inférieure de la quantification; LOD : limite de la détection; nM : nanomolaire; UPLC-MS : chromatographie liquide ultra-haute performance couplée à une spectrométrie de masse.

* L'exactitude de la méthode est exprimée de la façon suivante : [(moyenne de la concentration observée moins le contrôle négatif)/(concentration du pic)] x 100.

4.3 Données fournies par le demandeur

Les données locales de validation du dosage des 21 acylglycines urinaires (15 de façon quantitative et 6 de façon semi-quantitative) par la LC-MS/MS du CHUS sont présentées dans le tableau 6 (pour plus de détails, voir l'annexe C).

Tableau 6 Données locales de validation de l'analyse des 21 acylglycines urinaires par la LC-MS/MS au CHUS

VALIDATION DE L'ANALYSE DES ACYLGLYCINES URINAIRES AU CHUS		DONNÉES LOCALES* Dosage quantitatif - 15 acylglycines (Dosage semi-quantitatif - 6 acylglycines)
Linéarité	Coefficient de corrélation (R^2)	0,99837 – 0,99975 (0,99591 – 0,99931)
	Concentrations	0,01 – 100 µM (0,01 – 100 µM)
Précision	Intrajour (CV)	4,1 % – 10,0 % (5,2 % – 43,6 %)
	Interjour (CV)	5,3 % – 14,0 % (7,1 % – 27,2 %)
Exactitude	Intrajour (CV)	99,3 % – 111,3 % (65,5 % – 213,6 %)
	Interjour (CV)	101,1 % – 107,2 % (79,4 % – 220,7 %)
Stabilité - Recouvrement	Extrait – 10 jours à 23 °C	84,9 % – 131,0 % (72,6 % – 106,0 %)
	Contrôle matrice – 4 h à 23 °C	93,2 % – 101,2 % (57,4 % – 104,5 %)
	Contrôle matrice – 72 h à 4 °C	88,5 % – 110,7 % (79,7 % – 106,8 %)

Sigles : CV : Coefficient de variation; µM : micromolaire.

* Information fournie par le demandeur. Données pour l'ensemble des 21 acylglycines analysés (15 acylglycines dosés de façon quantitative et les 6 acylglycines dosés de façon semi-quantitative). Tirées du document : Résultats de la validation, « Dosage des acylglycines urinaires par LC-MS/MS ».

5 IMPACTS BUDGÉTAIRES

Les conséquences économiques de l'introduction de l'analyse dans le système de santé et de services sociaux québécois n'ont pas été analysées.

6 ENJEUX ORGANISATIONNELS, ÉTHIQUES, SOCIAUX ET JURIDIQUES

Les demandes d'analyses d'acylglycines urinaires sont actuellement envoyées hors Québec à Mayo Medical Laboratories aux États-Unis. En plus d'obtenir un résultat rapide (24 heures si la situation clinique l'exige), le test du demandeur utilise une méthodologie plus sensible, détecte un plus grand nombre d'acylglycines et cible plus de maladies métaboliques que le test offert par le Mayo Medical Laboratories aux États-Unis.

Du point de vue organisationnel, le laboratoire de génétique biochimique du CHUS est désigné par le ministère de la Santé et des Services sociaux comme laboratoire de confirmation biochimique des maladies dépistées par la MS/MS en raison de son expérience et de son expertise dans les domaines des maladies métaboliques héréditaires et de la spectrométrie de masse. Son rôle est de confirmer ou de réfuter un diagnostic provisoire

issu du dépistage sanguin et urinaire chez les nouveau-nés. L'analyse inclut actuellement le dépistage du MCADD.

7 POSITIONS OU ORIENTATIONS D'AUTRES ORGANISATIONS

L'American College of Medical Genetics a notamment publié trois algorithmes de confirmation diagnostique de certaines EIM [ACMG, 2009a; 2009b; 2009c]. Ces algorithmes incluent l'analyse des acylcarnitines sériques, des acides organiques urinaires et des acylglycines urinaires pour confirmer le diagnostic du MCADD, de l'acidémie glutarique de type II, de l'encéphalopathie éthylmalonique, du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte et du déficit en isobutyryl CoA déshydrogénase (annexes D à F) [ACMG, 2012a; 2012b; 2012c].

Lors de l'usage de la présente analyse dans le suivi d'un dépistage néonatal, des algorithmes seront établis pour chaque maladie ajoutée à la liste d'EIM dépistées, après consultation du comité provincial pour le dépistage néonatal⁸.

8 SYNTHÈSE DE L'ÉVALUATION

La LC-MS/MS permet l'identification et le dosage de certains acylglycines qui étaient auparavant indétectables, y compris, notamment, la différenciation d'isomères d'acylglycines. Elle permet de détecter plusieurs métabolites en un seul test avec un rendement élevé en plus d'être une méthode sensible, spécifique et de ne requérir qu'un entretien minimal de l'équipement.

Deux études ont décrit l'analyse d'acylglycines urinaires d'échantillons provenant de cas cliniques, illustrant ainsi le rôle complémentaire de cette analyse par rapport à celles des acides organiques urinaires et des acylcarnitines sériques dans le diagnostic des EIM.

Trois études retenues ont montré que la LC-MS/MS offre une grande sensibilité de détection, en plus d'être précise (CV < 12 %), reproductible (CV < 15 %) et exacte (CV < 15 %). De plus, le taux de recouvrement est supérieur à 90 % et aucune interférence n'a été observée.

L'analyse des acylglycines urinaires par la LC-MS/MS proposée par le demandeur permet de détecter 21 acylglycines. Les données analytiques fournies démontrent que cette méthode est précise (CV < 14 %), exacte (98,7 % - 111,3 %) et que le taux de recouvrement est généralement supérieur à 90 %.

Trois algorithmes publiés par l'American College of Medical Genetics incluent notamment l'analyse des acylcarnitines sériques, des acides organiques urinaires et des acylglycines urinaires pour confirmer le diagnostic du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne, de l'acidémie glutarique de type II, de l'encéphalopathie éthylmalonique, du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte et du déficit en isobutyryl CoA déshydrogénase.

8. Information fournie par le demandeur.

9 RECOMMANDATION DE L'INESSS

Dosage des acylglycines urinaires par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem

La recommandation de l'INESSS

- ☒ Introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Refus d'introduction de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Maintien de l'analyse dans le *Répertoire*
- ☐ Retrait de l'analyse du *Répertoire*

Précisions accompagnant la recommandation

- ✓ Le laboratoire de génétique biochimique du CHUS est désigné par le ministère de la Santé et des Services sociaux comme laboratoire de confirmation biochimique des maladies dépistées par la spectrométrie de masse en tandem.

ANNEXE A

Caractéristiques du profil des acylglycines urinaires dans les désordres métaboliques

Profil des acylglycines urinaires associés aux désordres métaboliques

DÉSORDRE	ACYLGLYCINE URINAIRE
<i>Aciduries organiques</i>	
Acidémie isovalérique	Isovalérylglycine
Déficit multiple en carboxylases	3-Méthylcrotonylglycine
Déficit en bêta-cétothiolase	Tiglylglycine
<i>Désordres de la bêta-oxydation des acides gras</i>	
Acidémie glutarique de type II	Isovalérylglycine Isobutyrylglycine 2-Méthylbutyrylglycine
Déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne	Hexanoylglycine 3-Phénylpropionylglycine Suberylglycine
Encéphalopathie éthylmalonique	Isobutyrylglycine Isovalérylglycine 2-Méthylbutyrylglycine Hexanoylglycine

Source : La Marca et Rizzo, 2011; Gregersen, 2007.

ANNEXE B

Liste des acylglycines détectés par la méthodologie du Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke et des autres études retenues

Liste des acylglycines urinaires détectés par les méthodes de LC-MS/MS et leurs variantes

ACYLGLYCINE (ABRÉVIATION)	CHUS (N = 21)	FONG <i>ET AL.</i> , 2012 (N = 9)	STANISLAUS <i>ET AL.</i> , 2012 (N = 18)	OMBRONE <i>ET AL.</i> , 2011 (N = 19)
Acetylglycine (AG)	x		x	
[4,4,4-D ₃]Butyrylglycine				x
Butyrylglycine (BG)	x	x	x	x
Crotonylglycine (CG)	x			
Decanoylglycine (DeG)	x*			
Dodecanoylglycine (DoG)	x*			
Furoylglycine (FG)			x	
Glutarylglucose (GG)			x	
4-Hydroxyphenylacetylglucose (HPAG)			x	
Heptanoylglycine (HpG)	x		x	
[6,6,6-D ₃]Hexanoylglycine				x
Hexanoylglycine (HG)	x	x	x	x
[D ₇]Isobutyrylglycine				x
Isobutyrylglycine (IBG)	x	x	x	x
[D ₉]Isovalerylglucose				x
Isovalerylglucose (IVG)	x	x	x	x
(D,L)-[D ₉]2-Methylbutyrylglycine				x
2-Methylbutyrylglycine (2MBG)	x	x	x	x
3-Methylcrotonylglucose (3MCG)	x		x	x
3-Methylcrotonyl-[¹³ C ₂]glucose				x
Myristoylglycine (MyG)	x*			
Octanoylglycine (OG)	x		x	
Oleoylglycine (OIG)	x*			
Palmitoylglycine (PaG)	x*		x	
[D ₅]Phenylpropionylglucose				x
Phenylpropionylglucose (PPG)	x	x	x	x
Pivaloylglycine (PvG)	x*			

ACYLGLYCINE (ABRÉVIATION)	CHUS (N = 21)	FONG <i>ET</i> <i>AL.</i>, 2012 (N = 9)	STANISLAUS <i>ET AL.</i>, 2012 (N = 18)	OMBRONE <i>ET</i> <i>AL.</i>, 2011 (N = 19)
[3,3,3-D ₃]Propionylglycine				x
Propionylglycine (PG)	x	x	x	x
Suberylglycine (SG)	x	x	x	x
Tiglylglycine (TG)	x	x	x	x
Valerylglycine (VG)	x		x	x

Acronyme : CHUS : Centre hospitalier universitaire de Sherbrooke.

ANNEXE C

Validation de l'analyse des acylglycines urinaires par la LC-MS/MS au CHUS

Résultats de la validation de l'analyse « Dosage des acylglycines urinaires par la LC-MS/MS » au CHUS (données fournies par le demandeur)

Acylglycine	Stabilité - Recouvrement (%)								
	Linéarité		Précision (% CV)		Exactitude (%)		Extrait 10 jours à 23 °C	Contrôle matrice	
	Plage	R ²	Intrajour	Interjour	Intrajour	Interjour		4 h à 23 °C	72 h à 4 °C
Créatinine	0,05 - 30 mM	0,99935	3,4	3,4	98,7	98,9	101,3	97,3	95,8
Acetylglycine	0,01 - 100 µM	0,99874	6,2	10,8	99,3	102,5	90,9	95,8	95,4
Propionylglycine	0,01 - 100 µM	0,99837	10,0	14,0	104,6	101,1	84,9	93,2	88,5
Crotonylglycine	0,01 - 100 µM	0,99932	5,2	5,8	106,2	103,2	103,3	99,5	101,1
Isobutyrylglycine	0,01 - 100 µM	0,99957	5,1	7,2	102,8	105,2	102,9	95,9	93,4
Butyrylglycine	0,01 - 100 µM	0,99946	4,2	10,6	111,3	107,2	113,2	96,4	94,1
Tiglylglycine	0,01 - 100 µM	0,99951	5,1	5,7	101,7	102,0	103,6	98,7	96,3
3-Methyl crotonylglycine	0,01 - 100 µM	0,99933	4,6	7,5	108,5	104,3	102,5	98,5	100,9
2-Methylbutyrylglycine	0,01 - 100 µM	0,99975	5,4	7,3	103,8	104,3	110,6	96,5	91,3
Pivaloylglycine*	0,01 - 100 µM	0,99674	9,5	20,2	213,6	220,7	106,0	104,5	106,8
Isovalerylglycine	0,01 - 100 µM	0,99958	4,1	5,3	102,7	101,6	107,7	97,8	110,7
Valerylglycine	0,01 - 100 µM	0,99944	4,7	8,0	109,6	105,7	108,8	101,2	100,7
Hexanoylglycine	0,01 - 100 µM	0,99893	5,4	6,2	105,6	102,0	104,2	100,1	100,3
Phenylpropionylglycine	0,01 - 100 µM	0,99936	7,2	7,7	104,1	104,2	104,8	98,9	96,1

Heptanoylglycine	0,01 - 100 µM	0,99940	6,5	5,8	108,9	106,3	96,1	98,3	100,4
Octanoylglycine	0,01 - 100 µM	0,99918	5,7	5,3	104,2	104,7	100,3	99,5	100,8
Suberylglycine	0,01 - 100 µM	0,99932	4,6	8,0	108,6	105,0	131,0	96,4	95,4
Decanoylglycine*	0,01 - 100 µM	0,99931	5,2	7,1	99,8	100,3	101,5	97,1	97,1
Dodecanoylglycine*	0,01 - 100 µM	0,99593	10,0	12,9	78,6	88,5	91,8	90,7	88,0
Myristoylglycine*	0,01 - 100 µM	0,99813	16,5	21,5	65,5	80,4	72,6	82,3	79,7
Palmitoylglycine*	0,01 - 100 µM	0,99840	43,6	27,2	121,1	118,3	93,7	57,4	90,8
Oleoylglycine*	0,01 - 100 µM	0,99591	6,7	13,6	69,5	79,4	87,2	72,5	86,8

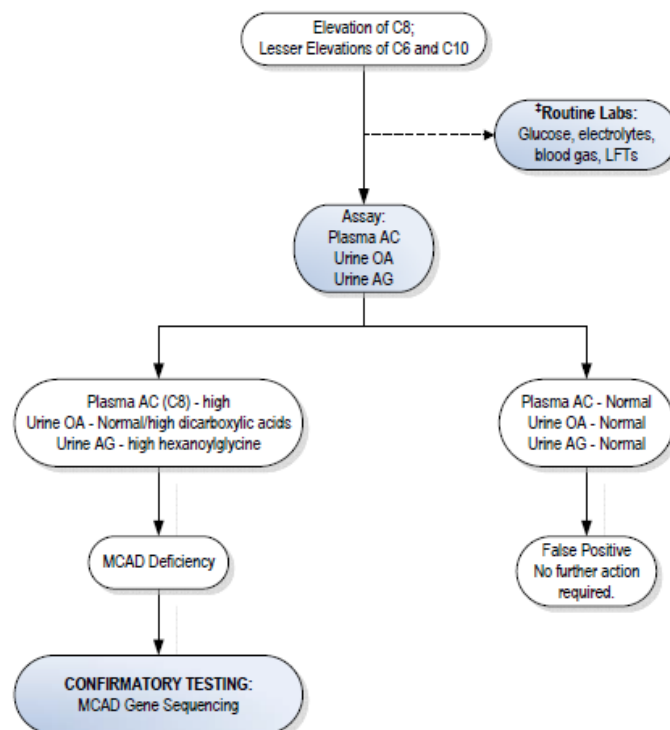
*Analyse semi-quantitative : les résultats des acylglycines PvG, DeG, DoG, MyG, PaG et OIG sont considérés comme semi-quantitatifs, car aucun standard interne n'est disponible pour PvG, DeG, DoG, MyG, et OIG. Bien qu'il y ait un standard interne pour PaG, ce dernier est considéré comme semi-quantitatif en raison d'une très grande variabilité inexpliquée. Plusieurs tests seraient nécessaires pour déterminer l'origine de cette variation. Étant donné la faible importance, il a été décidé qu'une valeur semi-quantitative serait suffisante. Une déviation plus petite de $\pm 20\%$ est acceptable pour les valeurs quantitatives. Si deux contrôles et plus ne respectent pas les critères d'acceptabilité, la séquence doit être reprise (information tirée du protocole du CHUS, PRG-8200-ACGUR-01-A).

ANNEXE D

Algorithme utilisé par l'American College of Medical Genetics pour le dépistage du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne moyenne



C8 Elevated + Lesser Elevations of C6 and C10



Abbreviations/Key

AC = acylcarnitine
AG = acylglycine
LFTs = liver function tests
MCAD = Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
OA = organic acid

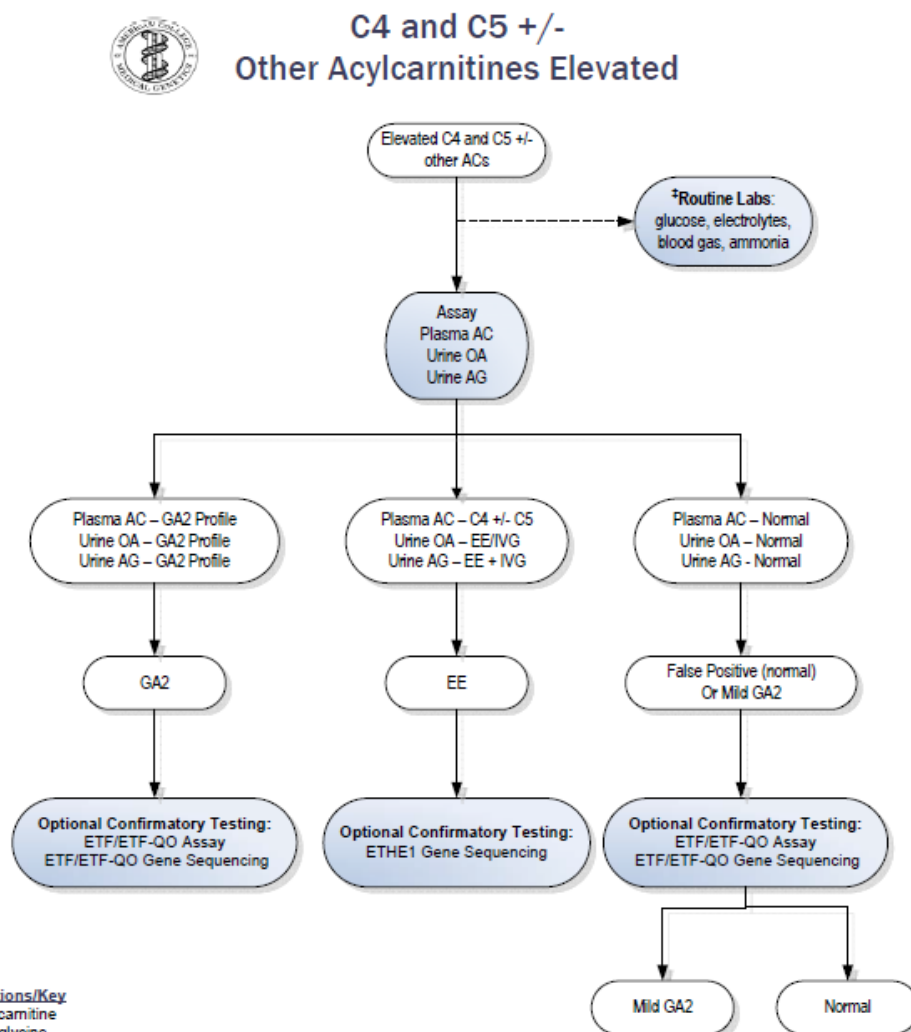
‡ = When the positive predictive value of screening is sufficiently high and the risk to the newborn is high, some initiate diagnostic studies that are locally available at the same time as confirmation of the screening result is done.

Actions are shown in shaded boxes; results are in the unshaded boxes.

Source : ACMG, 2009a.

ANNEXE E

Algorithme utilisé par l'American College of Medical Genetics pour le dépistage de l'acidémie glutarique de type II et de l'encéphalopathie éthylmalonique



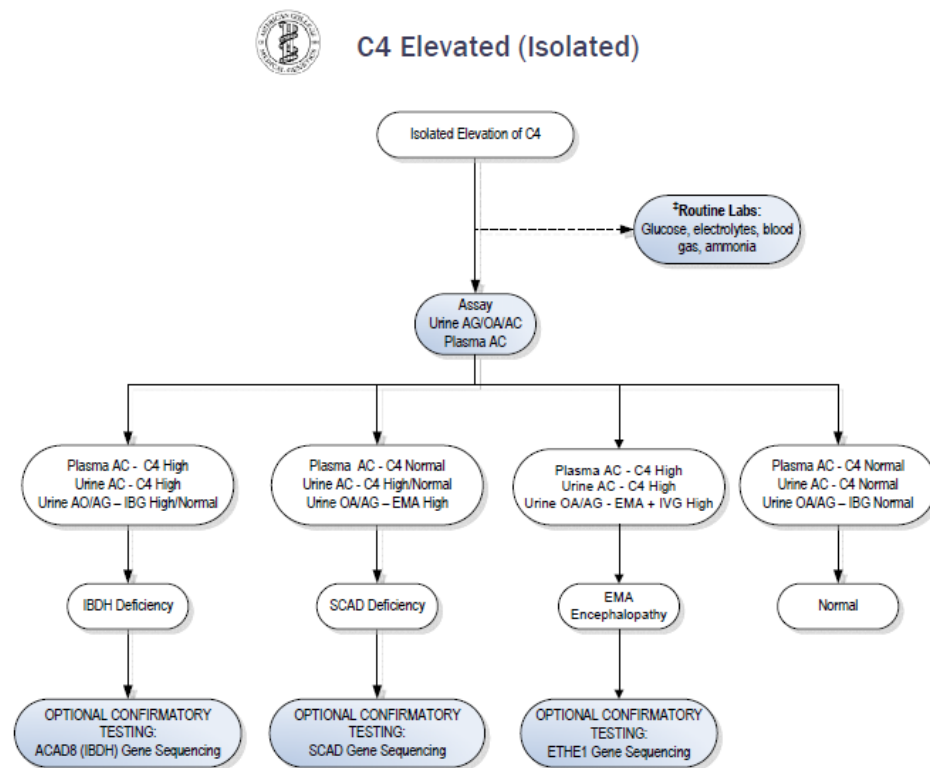
‡ = When the positive predictive value of screening is sufficiently high, some initiate diagnostic studies that are locally available at the same time as confirmation of the screening result is done.

Actions are shown in shaded boxes; results are in the unshaded boxes.

Source : ACMG, 2009c.

ANNEXE F

Algorithme utilisé par l'American College of Medical Genetics pour le dépistage de l'encéphalopathie éthylmalonique, du déficit en acyl-CoA déshydrogénase des acides gras à chaîne courte et du déficit en isobutyryl CoA déshydrogénase



Abbreviations/ Key:

AC = acylcarnitine
 ACAD8 = Acyl-CoA dehydrogenase family, member 8
 AG = acylglycine
 C4 = C4 acylcarnitine
 EMA = ethylmalonic acid
 IBDH = isobutyryl-CoA dehydrogenase
 IBG = isovalerylglutamate
 IVG = isovalerylglutamate
 OA = organic acid
 SCAD = short chain acyl-CoA dehydrogenase

† = When the positive predictive value of screening is high and the risk to the infant is high, some initiate diagnostic studies that are locally available at the same time as confirmation of the screening result is done.

Actions are shown in shaded boxes; results are in the unshaded boxes.

Source : ACMG, 2009b.

RÉFÉRENCES

- Agence d'évaluation des technologies et des modes d'intervention en santé (AETMIS). La spectrométrie de masse en tandem et le dépistage néonatal sanguin au Québec : rapport sommaire. Rapport sommaire préparé par Héra Makni, Carole St-Hilaire, Laura Robb, Kathy Larouche et Ingeborg Blancquaert. ETMIS 2007;3(3):1-79.
- American College of Medical Genetics (ACMG). Newborn screening ACT sheet [Elevated C8 with lesser elevations of C6 and C10 acylcarnitine]. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency. Bethesda, MD : ACMG; 2012a. Disponible à : <http://www.ok.gov/health2/documents/Medium-chain%20Acyl-CoA%20Dehydrogenase%20Deficiency%20ACT%20Sheet%20&%20Algorithm.pdf>.
- American College of Medical Genetics (ACMG). Newborn screening ACT sheet [Elevated C4 acylcarnitine]. Short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency. Bethesda, MD : ACMG; 2012b. Disponible à : <https://www.acmg.net/StaticContent/ACT/C4.pdf>.
- American College of Medical Genetics (ACMG). Newborn screening ACT sheet [Elevated C4 and C5 +/- other acylcarnitines]. Glutaric aciduria type 2 (GA2). Bethesda, MD : ACMG; 2012c. Disponible à : https://www.acmg.net/StaticContent/ACT/C4_C5.pdf.
- American College of Medical Genetics (ACMG). C8 Elevated + Lesser Elevations of C6 and C10 [algorithmique clinique]. Bethesda, MD : ACMG; 2009a. Disponible à : https://www.acmg.net/StaticContent/ACT/Algorithms/Visio-C8.vsd;_C6-C10.pdf.
- American College of Medical Genetics (ACMG). C4 Elevated (Isolated) [algorithmique clinique]. Bethesda, MD : ACMG; 2009b. Disponible à : <https://www.acmg.net/StaticContent/ACT/Algorithms/Visio-C4.pdf>.
- American College of Medical Genetics (ACMG). C4 and C5 +/- Other Acylcarnitines Elevated [algorithmique clinique]. Bethesda, MD : ACMG; 2009c. Disponible à : https://www.acmg.net/StaticContent/ACT/Algorithms/Visio-C4_C5_+--_other_AC.pdf.
- Ciccimaro E et Blair IA. Stable-isotope dilution LC-MS for quantitative biomarker analysis. Bioanalysis 2010;2(2):311-41.
- Fong BM, Tam S, Leung KS. Quantification of acylglycines in human urine by HPLC electrospray ionization-tandem mass spectrometry and the establishment of pediatric reference interval in local Chinese. Talanta 2012;88:193-200.
- Fukao T. Déficit en bêta-cétothiolase. Paris, France : Orphanet; 2015. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=134.
- Grebe SK et Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory—Where to from here? Clin Biochem Rev 2011;32(1):5-31.

- Gregersen N. Encéphalopathie éthylmalonique [site Web]. Paris, France : Orphanet; 2007. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=51188.
- Institut national d'excellence en santé et en services sociaux (INESSS). Pertinence d'élargir le programme de dépistage néonatal sanguin au Québec. Rapport rédigé par Brigitte Côté et Cathy Gosselin. ETMIS 2013;9(7):1-51. Disponible à : http://www.inesss.qc.ca/fileadmin/doc/INESSS/Rapports/Genetique/INESSS_Depistage_neonatal_sanguin.pdf.
- La Marca G et Rizzo C. Analysis of organic acids and acylglycines for the diagnosis of related inborn errors of metabolism by GC- and HPLC-MS. *Methods Mol Biol* 2011;708:73-98.
- Lehotay DC, Hall P, Lepage J, Eichhorst JC, Etter ML, Greenberg CR. LC-MS/MS progress in newborn screening. *Clin Biochem* 2011;44(1):21-31.
- Lewis-Stanislaus AE et Li L. A method for comprehensive analysis of urinary acylglycines by using ultra-performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 2010;21(12):2105-16.
- Matern D et Rinaldo P. Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency [site Web]. Dans : Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., réd. *GeneReviews*®. Seattle, WA : University of Washington; 2015. Disponible à : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301597>.
- Ombrore D, Salvatore F, Ruoppolo M. Quantitative liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry analysis of urinary acylglycines: Application to the diagnosis of inborn errors of metabolism. *Anal Biochem* 2011;417(1):122-8.
- Orphanet. Acidémie isovalérique [site Web]. Paris, France : Orphanet; 2005. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=33.
- Raghuveer TS, Garg U, Graf WD. Inborn errors of metabolism in infancy and early childhood: An update. *Am Fam Physician* 2006;73(11):1981-90.
- Saudubray J-M. Déficit multiple en acyl-CoA déshydrogénases [site Web]. Paris, France : Orphanet; 2004. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=26791.
- Stanislaus A, Guo K, Li L. Development of an isotope labeling ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometric method for quantification of acylglycines in human urine. *Anal Chim Acta* 2012;750:161-72.
- Wolf B. Déficit multiple en carboxylases [site Web]. Paris, France : Orphanet; 2011. Disponible à : http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=148.