

ARTICOL ORIGINAL

Importanța profilului aminoacizilor plasmatici în diagnosticul erorilor înnăscute de metabolism: studiu prospectiv, analitic

Victoria Hlistun^{1*}, Egor Efremov¹, Daniela Blăniță¹, Chiril Boiciuc¹, Calin Deleanu^{2,3}, Alina Nicolescu^{2,3}, Natalia Ușurelu¹

¹Institutul Mamei și Copilului, Chișinău, Moldova;

²Institutul de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” al Academiei Române, Iași, România;

³Centru de Chimie Organică „C. D. Nenitescu” al Academiei Române, București, România.

Data primirii manuscrisului: 13.01.2022

Data acceptării spre publicare: 24.02.2022

Autor corespondent:

Victoria Hlistun, cercetător științific,
Laboratorul de Genetică Moleculară Umană
Institutul Mamei și Copilului,
str. Burebista 93, Chișinău, Moldova, MD 2062.
e-mail: hlistunvica@yahoo.com

ORIGINAL ARTICLE

The importance of plasma amino acid profiling in the diagnosis of inborn errors of metabolism: analytical – prospective study

Victoria Hlistun^{1*}, Egor Efremov¹, Daniela Blăniță¹, Chiril Boiciuc¹, Calin Deleanu^{2,3}, Alina Nicolescu^{2,3}, Natalia Ușurelu¹

¹Institute of Mother and Child, Chisinau, Moldova;

²„Petru Poni” Institute of Macromolecular Chemistry, Romanian Academy, Iasi, Romania;

³„C. D. Nenitescu” Centre of Organic Chemistry, Romanian Academy, Bucharest, Romania.

Manuscript received on: 13.01.2022

Accepted for publication: 24.02.2022

Corresponding author:

Victoria Hlistun, scientific researcher
Human Molecular Genetic Laboratory
Institute of Mother and Child
93, Burebista str., Chisinau, Republic of Moldova, MD 2062
E-mail: hlistunvica@yahoo.com

Titlu scurt: Profilul aminoacizilor plasmatici în diagnosticul erorilor înnăscute de metabolism

Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

La moment nu se cunoaște profilul aminoacizilor plasmatici la pacienții cu erori înnăscute de metabolism (EIM) din Moldova; gradul de necesitate a analizei aminoacizilor la pacienții suspecți pentru EIM; rolul biomarkerilor din spectrul aminoacizilor în diagnosticul și diferențierea diferitor grupe de EIM.

Ipoteza de cercetare

Valorile aminoacizilor sunt anormale la pacienții suspecți pentru erori înnăscute de metabolism în special cele de tip intoxicație.

Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Analiza fluidelor biologice de la pacienții suspecți din Moldova prin mai multe metode analitice utilizate în metabolomică oferă posibilitatea de a evalua eficacitatea și complementaritatea acestora în diagnosticul EIM.

Short title: Plasma amino acid profiling in the diagnosis of inborn errors of metabolism

What is not known yet, about the topic?

At the moment it is not known: amino acid profile of patients with inborn errors of metabolism (IEM) from Moldova; necessity degree of amino acid analysis in suspected for IEM patients; the role of amino acid biomarkers in the diagnosis and differentiation of IEM groups.

Research hypothesis

Amino acids levels are abnormal in patient suspected for an IEM, especially for one of intoxication type.

Article's added novelty on this scientific topic

Analysis of biological fluids from suspected Moldavian patients through more analytical methods used in metabolomics offers the possibility of appreciating their efficiency and complementarity in the diagnosis of IEM.

Rezumat

Introducere. Erorile înnăscute de metabolism (EIM) alcătuiesc un grup larg de tulburări cauzate de un defect genetic al proteinelor care au rol enzimatic, de transport, receptor sau structural. Incidența cumulativă a EIM în diferite populații este în jur de 1:500 – 800 nou-născuți. Recunoașterea și intervenția timpurie sunt esențiale pentru a evita consecințele dezastruoase asociate cu EIM. Fenotipul pacienților cu EIM este foarte eterogen și numai în combinație cu teste metabolice specializate poate conduce spre un diagnostic corect. Scopul studiului a fost definit ca evaluarea importanței profilului aminoacizilor plasmatici în diagnosticul EIM.

Material și metode. Cuantificare aminoacizilor, prin cromatografie lichidă de înaltă performanță la analizatorul Shimadzu LC-20 cu derivatizare post-coloană cu OPA, a fost realizată în plasma a 15 pacienți cu vârste cuprinse între 0-13 ani, selectați în urma consultului genetic în baza criteriilor de includere și excludere. Părinții tuturor copiilor au semnat consimțământul în urma informării detaliate cu privire la studiu. Suplimentar au fost realizate teste complementare cum ar fi cromatografie lichidă cuplată cu spectroscopie de masă în pete de sânge uscate și spectroscopie prin rezonanță magnetică nucleară în urină.

Rezultate. Investigațiile de primă linie au arătat dezechilibrul acido – bazic (33,3%), hipoglicemie (46,6%), valori crescute ale acidului lactic (46,6%) și amoniacului (20%). Au fost identificate valori anormale ale concentrației aminoacizilor în plasma a 4 copii (27%). Valori mărite ale glicinei (544 $\mu\text{mol/L}$, valori de referință 70,72 – 256,36 $\mu\text{mol/L}$), de rând cu raportul crescut al glicinei în lichid cefalorahidian / plasmă (0,147, normal < 0.02) au fost identificate în cazul unui pacient cu convulsii, comă și arest respirator, făcându-se suspect pentru Hiperglicinemie Noncetotică. Nivel crescut de fenilalanină (*Phe* 1568 $\mu\text{mol/L}$, valori de referință 26.52 – 221 $\mu\text{mol/L}$) a fost identificat la un pacient suspect pentru Fenilcetonurie în urma rezultatelor screening-ului neonatal (*Phe* > 3mg/dL). La fel, valoarea raportului dintre aminoacizii *Phe* și tirozină (*Tyr*) în jur de 17 este specific pentru forma clasică a Fenilcetonuriei. Concentrații crescute de alanină (> 450 $\mu\text{mol/L}$) au fost observate în cazul a 2 pacienți prezentând acidoze metabolice severe și valori ridicate ale acidului lactic fiind sugerată o eroare metabolică cu implicare mitocondrială. Rezultatele screening-ului metabolic neonatal extins și spectroscopiei RMN au îngustat spectrul suspiciunilor, facilitând astfel diagnosticul. În toate cazurile cu profil anormal al aminoacizilor în plasma se necesită aplicarea testelor genetice confirmatorii.

Concluzii. Analiza cantitativă a aminoacizilor este un instrument important pentru diagnosticul EIM de „tip intoxicație” și monitorizarea nutrițională a persoanelor cu diagnostic deja stabilit.

Cuvinte cheie: Aminoacizi, cromatografie lichidă, erori înnăscute de metabolism

Abstract

Introduction. Inborn errors of metabolism (IEM) make up a large group of disorders caused by an inherited defect of proteins that have enzymatic, carrier, receptor or structural roles. The cumulative prevalence of IEM in different populations is around 1:500 – 800 newborns, despite the fact that some of these disorders are extremely rare when taken individually. Early recognition and intervention are essential to avoiding disastrous consequences associated with IEM. The phenotype of IEM patients is very heterogeneous and only in combination with specialized metabolic test it can lead to a correct diagnosis. The aim of the study was defined as evaluation of importance of plasma amino acid profile in the diagnosis of IEM.

Material and methods. Plasma amino acids quantification have been performed by high performance liquid chromatography on Shimadzu LC-20 with post column derivatization with OPA in 15 patients aged from 0 to 13 years old, selected through medical genetic counseling, based on inclusion and exclusion criteria. Inform consent has been signed by parents after receiving all necessary information regarding the study. Additionally, liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on dried blood spots and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (H1-NMR) on urine has been done as complementary tests.

Results. The first line investigations showed acid-base imbalance (33,3%), hypoglycemia (46,6%), high lactate level (46,6%) and high ammonia level (20%). Plasma amino acid concentrations were abnormal in 4 patients (27%). Increased glycine (544 $\mu\text{mol/L}$, reference values 70,72 – 256,36 $\mu\text{mol/L}$), along with elevated glycine in cerebrospinal fluid (CSF) / plasma ratio (0,147, normal < 0.02) was detected in a patient with seizures, coma, and respiratory arrest indicating non-ketotic hyperglycinemia. High level of phenylalanine (*Phe* 1568 $\mu\text{mol/L}$, reference values 26.52 – 221 $\mu\text{mol/L}$) has been identified in a patient suspected for Phenylketonuria after neonatal screening results (*Phe* > 3mg/dL). Also the ratio *Phe* / *Tyr* around 17 was specifically appreciated as for classical form of PKU. High alanine concentration (> 450 $\mu\text{mol/L}$) has been observed in two patients presenting severe metabolic acidosis and high lactate level, suggesting for a metabolic error with mitochondrial involvement. The results from extended newborn screening and NMR spectroscopy narrowed the spectrum of suspected diseases, facilitating the diagnosis. Molecular genetic tests are required for the confirmation of disease in all cases.

Conclusions. Quantitative amino acids analysis is an important tool for the diagnosis of “intoxication type” of IEMs and nutritional monitoring of individuals with already established diagnosis.

Key words: Amino acids, liquid chromatography, inborn errors of metabolism.

Introducere

Erorile înnăscute de metabolism (EIM) formează un grup de patologii rezultate dintr-un defect genetic în funcționarea unei căi metabolice intermediare la nivel de enzimă, transport membranar sau alte proteine, ducând la acumularea toxică de substrat și / sau deficiența unui produs biologic important [1]. Au fost descrise mai mult de 1000 EIM [2]. Unele dintre aceste tulburări sunt extrem de rare luate individual, însă incidența cumulativă constituie în jur de 1:500–800 nou-născuți în diferite populații [3-6]. Majoritatea EIM sunt cu transmitere autosomal recesivă. O minoritate dintre aceste patologii se transmite autosomal dominant, X-linkat sau mitocondrial pe linie maternă, în subseturile de tulburări ale lanțului respirator [7, 8].

Cele mai multe EIM de tip intoxicație sunt potențial tratabile, iar măsurile de diagnostic și terapeutice întreprinse cât mai curând posibil sunt esențiale pentru sănătatea pe termen lung ai subiecților afectați [9]. Diagnosticul EIM se stabilește în baza evaluării manifestărilor clinice ale pacienților și work-upului metabolic, care include teste specializate cum ar fi profilul aminoacizilor în sânge și urină, profilul acilcarnitinic, acizii organici urinari și teste analitice specifice pentru a identifica niveluri anormal de ridicate și / sau scăzute de metaboliți cauzate de blocarea enzimatică a căilor metabolice [10]. Analiza cantitativă a aminoacizilor este un instrument important pentru diagnosticul EIM de tip intoxicație: aminoacidopatii, tulburări ale ciclului ureei, unele acidurii organice, precum și oferă indici pentru patologii cu implicare mitocondrială.

În acest context, scopul acestui studiu a fost definit ca evaluarea importanței profilului aminoacizilor plasmatici în diagnosticul EIM. Odată ce diagnosticul este stabilit, sunt urmăriți biomarkeri specifici din spectrul aminoacizilor pentru a monitoriza managementul clinic al pacientului.

Materiale și metode

Acest studiu prospectiv analitic a fost realizat în cadrul proiectului „Medicina genomică și cercetarea metabolomică în serviciul profilaxiei maladiilor genetice pentru generații sănătoase în Republica Moldova” (Acronim: SCRENGEN, cifrul: 20.80009.8007.22) în Institutul Mamei și Copilului. Protocolul de cercetare a fost aprobat de către Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu” din Moldova (proces verbal nr. 2 din 15.12.2020, semnat de către președintele comitetului – profesor Victor Vovc)

Au fost supuși analizei cromatografice a aminoacizilor 15 copii cu vârsta cuprinsă între 0 – 13 ani, ai căror părinți au semnat acordul informat în urma informării detaliate cu privire la studiu. Pacienții au fost aleși în urma consultului genetic în baza manifestărilor clinice specifice pentru EIM de tip intoxicație. Prin urmare, în studiu a fost inclus orice nou-născut sau copil fără particularități ale sarcinii și nașterii în anamnezic, dar care prezintă deteriorare bruscă și progresivă a stării de sănătate asociată cu dezechilibru acido-bazic, hipoglicemie, letargie, comă, vome, hiperamoniemie, întâzieri în dezvoltare, dereglarea inexplicată a funcției hepatice, semne cardiace (aritmie, cardiomiopatie,

Introduction

Inborn errors of metabolism (IEM) are a phenotypically and genetically heterogeneous group of disorders, caused by mutations in specific genes that encode enzymes, membrane transporters, and other functional proteins that produce a block on a metabolic pathway, leading to the toxic accumulation of substrate and / or a deficiency of an important biological product [1]. More than 1000 IEM have been described [2]. The cumulative prevalence of IEM in different populations is around 1:500–800 newborns [3-5], despite the fact that some of these disorders are extremely rare when taken individually [6]. Most of IEM are inherited in an autosomal recessive way. A minority of them is transmitted as autosomal dominant, X-linked or by mitochondrial DNA only of maternal origin, as in subsets of respiratory chain disorders [7, 8].

Most of the “*intoxication type*” of the IEM are potentially treatable and appropriate diagnosis and therapeutic measures must be initiated as soon as possible to avoid long-term damage [9]. The diagnosis of IEMs is based on evaluation of clinical manifestations of the patient and metabolic workup including specialized analyses as blood and urine amino acids, blood spot acylcarnitine profile, urine organic acids, and specific analytical tests, in order to identify abnormally high and / or low levels of metabolites caused by the enzymatic blockage of a metabolic pathways [10]. Quantitative amino acids analysis is an important tool for the diagnosis of “*intoxication type*” of IEM as: aminoacidopathies, urea cycle disorders, some organic acidurias as well as it could offers some clues for mitochondrial disorders.

In this context the aim of the study was defined as evaluation of importance of plasma amino acid profile in the diagnosis of IEM. As the diagnosis is performed, specific biomarkers are followed to monitor clinical management of the patient.

Material and methods

This analytical prospective study was done within the project «Genomic medicine and metabolomics research in the service of prophylaxis of genetic diseases for healthy generations in the Republic of Moldova» (Acronym: SCRENGEN, Cipher: 20.80009.8007.22) in Institute of Mother and Child from Chisinau, Republic of Moldova. The research protocol was approved by the Ethics Research Committee of SUMP “Nicolae Testemițanu”, from the Republic of Moldova (verbal process no. 2 from 15.12.2020, signed by the president of the committee – Professor Vovc Victor).

Amino acids analysis was performed in 15 children aged from 0 to 13 years old, which parents signed inform consent after receiving all necessary information. The subjects were chosen through medical genetic consulting based on clinical manifestations specific for “*intoxication type*” of IEM. In the study there was included any newborn or child without particularities of pregnancy and birth in medical history, but who presents a sudden and progressive deterioration of health associated with: acid-base imbalance, hypoglycemia, lethargy, coma, vomiting, hyperammonemia, developmental delays, unexplained liver function disorder, cardiac signs (ar-

cardiomegalie), simptome neurologice inexplicabile (encefalită acută, dizabilități intelectuale, convulsii), conștiință redusă, mai ales după episoade de vomă, febră sau foame [11-13]. Copiii cu o maladie metabolică confirmată, precum și cei ai căror tutore nu am semnat acordul informat au fost excluși din studiu.

Pacienții suspecți, cu diagnostic neclar au fost supuși unui complex de analize metabolice, inclusiv investigații de primă linie – teste de rutină realizate în unitățile spitalicești și investigații de linia a doua care acoperă analize mult mai complexe, realizate în laboratoare specializate, ca cuantificarea aminoacizilor plasmatici prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC) în cadrul Institutului Mamei și Copilului, Chișinău, Moldova, screening metabolic extins din pete de sânge uscate (DBS) prin cromatografie lichidă cuplată cu spectrometrie de masă (LC-MS/MS) în cadrul Laboratorului Medical CytoGenomic, București, România și acizi organici urinari prin spectroscopie prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) în cadrul Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” al Academiei Române, Iași, Romania.

Pentru analizele planificate în studiu, au fost colectate fluide biologice (sânge și urină) de la toți pacienții incluși în studiu. Sângele periferic a fost colectat prin puncție venoasă, pe nemâncate în eprubete de 5 ml cu K3EDTA. Sângele ulterior a fost centrifugat (4500 rpm timp de 10 min), iar plasma a fost transferată în eprubete de 1,5 ml și stocată la - 80°C până la analiza cromatografică.

Ulterior, lipidele și proteinele au fost îndepărtate din plasmă, apoi amestecul obținut a fost filtrat prin filtru de seringă cu dimensiunea porilor membranari de 0,45 μm într-o vială de 2 ml și introdusă în analizorul de aminoacizi. Aminoacizii au fost cuantificați prin cromatografie lichidă de înaltă performanță (HPLC, Shimadzu) cu coloană cromatografică Shim-pack Amino-Na, 100 mmL × 6,0 mmI.D., 5 μm, derivatizare post-coloană cu O-phtalaldehidă (OPA) și detector fluorescent. Procedura analitică de cuantificare a aminoacizilor a fost realizată conform manualului „Amino Acid Analysis System for high-sensitivity measurement of amino acids in foods and biological samples”. Metoda cromatografică a fost calibrată utilizând standardul „Amino acid standards, physiological, analytical standard, acidic, neutrals, and basics”, Merck, Germany. În calitate de standard intern a fost utilizată norvalina.

Urina de dimineața a fost colectată de la pacienții cu vârsta cuprinsă între 3 – 13 ani în containere speciale și păstrată în frigider (+ 4°C) până la 8 ore sau la congelator (- 20°C) pentru o perioadă mai lungă. În schimb, urina nou-născuților și copiilor până la 3 ani a fost colectată aleator pe parcursul zilei în pungi colectoare speciale.

Rezultate

În cadrul studiului au fost selectați 15 pacienți conform criteriilor de includere și excludere, ale căror manifestări clinice sunt prezentate în tabelul de mai jos (Tabelul 1).

La toți copiii au fost efectuate investigațiile metabolice de prima linie care includ echilibru acido-bazic, nivelul glucozei, lactatului și amoniacului. La 33,3% (n = 5) din copii a fost observat dezechilibru acido-bazic cu predominantă –

rhythmias, cardiomyopathies, cardiomegaly), unexplained neurological symptoms (acute encephalitis, intellectual disabilities, seizures), reduced consciousness, especially after episodes of vomiting, fever or hunger [11-13]. Children with a confirmed metabolic disease, which do not interfere with amino acid metabolism, were excluded from the study, the same for the patients who did not sign the informed consent.

A complex metabolic workup have been performed in the patients with unclear diagnosis including first line investigations – routine tests realized in the hospital units and second line investigations that cover more complex analysis, realized in specialized laboratory, as plasma amino acids by high performance liquid chromatography (HPLC) at the Institute of Mother and Child, Chisinau, Moldova, metabolic extended screening from dried blood spots (DBS) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) at CytoGenomic Medical Laboratory, Bucharest, Romania and urine organic acids by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy, at „Petru Poni” Institute of Macromolecular Chemistry of Romanian Academy, Iasi, Romania.

The selected patients were subjected to biological fluid collection, as blood and urine. Peripheral blood was drawn by venous puncture on fasting and collected into 5 mL K3EDTA-coated tubes. Then the blood was centrifuged (4500 rpm for 10 min), and plasma was transferred to 1.5 mL Eppendorf tubes and stored at - 80°C until chromatographic analysis were done.

Before analysis fat-soluble components and proteins have been removed from plasma, then the obtained mix was filtered through syringe filter, 0,45 μm membrane pore sizes in a 2 ml volume vial and introduced in the amino acid analyzer. Amino acids were profiled by High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Shimadzu) with chromatographic column Shim-pack Amino-Na, 100 mmL × 6,0 mmI.D., 5 μm, post-column derivatization with O-phtalaldehyde (OPA) and fluorescence detector. The analytical procedure used in this research for amino acids quantification was performed as described in Shimadzu manual „Amino Acid Analysis System for high-sensitivity measurement of amino acids in foods and biological samples”. The chromatographic method was calibrated using „Amino acid standards, physiological, analytical standard, acidic, neutrals, and basics”, Merck, Germany. Norvaline was used as internal standard.

Samples of urine were collected usually overnight from patients aged 3-13 years in special collection tubes and stored in the fridge (+ 4°C) for at most 8 hours or in the freezer at - 20°C for a longer period of storage. In contrast, newborns and infants sample required special collector bags that allow acquisition of urine randomly during the day.

Results

During the study, 15 patients have been selected for analysis according to inclusion and exclusion criteria, described in table below. (Table 1).

The first line metabolic investigations including acid-base balance, glucose, lactate and ammonia level have been done during patients hospitalization in all cases. In 33,3% (n = 5) there has been observed acid-base imbalance

Tabelul 1. Caracteristica clinică a pacienților incluși în studiu**Table 1.** The clinical characteristic of the patients involved in the study

Nr. pacient Patient no.	Sex Sex	Vârsta Age	Indicații pentru testarea aminoacizilor Indication for amino acid testing
Pacientul 1 Patient 1	m	2 a 2 yrs	Deteriorare bruscă și progresivă a stării de sănătate, convulsii, alcaloză metabolică (pH-7,54), lactat crescut (3,1 mmol/L) <i>Sudden and progressive deterioration of health, seizures, metabolic alkalosis pH-7,54, high lactate level (3,1 mmol/L)</i>
Pacientul 2 Patient 2	f	3 l 3 mo	Hipoglicemie (2,3-2,6 mmol/L), acidoză metabolică (pH - 7,28), lactat mărit (3,2 mmol/L), hipotonie musculară, hepatomegalie, retard în dezvoltare <i>Hypoglycemia (2,3-2,6 mmol/L); metabolic acidosis (pH 7,28); high lactate (3,2 mmol/L); muscular hypotonia; hepatomegaly, developmental delays,</i>
Pacientul 3 Patient 3	m	1 l 1 mo	Deteriorare bruscă și progresivă a stării de sănătate, vome, retard fizic, conștiință redusă mai ales după episoade de vomă, febră sau foame <i>Sudden and progressive deterioration of health, vomiting, physical retardation, reduced consciousness, especially after vomiting, fever or hunger</i>
Pacientul 4 Patient 4	f	1 a 1 yr	Convulsii, comă, hipotonie, arest respirator <i>Seizures, coma, hypotonia, respiratory arrest</i>
Pacientul 5 Patient 5	f	1 a 1 yr	Retard sever psiho-motor, fizic și în greutate, hipotonie musculară difuză, hepatomegalie, hiperlactatacidemie periodică <i>Severe psychomotor, physical and weight retardation, diffuse muscular hypotonia, hepatomegaly, periodic hyperlactacidemia</i>
Pacientul 6 Patient 6	f	2 a 2 yrs	Durere musculară, oboseală, intoleranță la exerciții fizice, hipotonie <i>Muscle pain, fatigue, physical exercise intolerance, hypotonia</i>
Pacientul 7 Patient 7	f	3 l 3 mo	Acidemie lactică (2,34 mmol/L), hipoglicemie (3,0 mmol/L), hiperamonemie (34 μmol/L), vome, hipotonie musculară <i>Lactic acidemia (2,34 mmol/L), hypoglycemia (3,0 mmol/L), hyperammonemia (34 μmol/L), vomiting, muscular hypotonia</i>
Pacientul 8 Patient 8	m	3 l 3 mo	Tulburări inexplicate ale funcției hepatice, hipotonie musculară, icter <i>Unexplained liver function disorder, muscular hypotonia, jaundice</i>
Pacientul 9 Patient 9	f	5 zile 5 days	Anamnezic familiar pentru fenilcetonurie, rezultate anormale ale screening-ului neonatal <i>Familial history for Phenylketonuria, abnormal screening results</i>
Pacientul 10 Patient 10	m	5 a 5 yrs	Deteriorare bruscă și progresivă a stării de sănătate, decompensare metabolică, letargie, dehidratare, conștiință redusă mai ales după episoade de vomă, febră sau foame, lactat crescut (2,57 mmol/L), hiperamonemie (272 μmol/L) <i>Sudden and progressive deterioration of health, metabolic decompensation, lethargy, dehydration, reduced consciousness, especially after vomiting, fever or hunger, high lactate (2,57 mmol/L), hyperammonemia (272 μmol/L)</i>
Pacientul 11 Patient 11	m	15 l 15 mo	Acidoză metabolică severă (pH 7,23), lactat crescut (3,1-5,9 mmol/L), crize cu tahipnee, tulburări respiratorii și alimentare, hipotonie, blefaroptoză, letargie, oboseală, alergii cutanate, sialoree și alopecie parțială. <i>Severe metabolic acidosis (pH 7,23); high lactate level (3,1-5,9 mmol/L), crisis with tachypnea, respiratory and feeding disorders, hypotonia, blepharoptosis, lethargy, fatigue, skin allergies, sialorrhea, and partial alopecia.</i>
Pacientul 12 Patient 12	m	4 a 4 yrs	Acidoză metabolică (pH 7,28), hipoglicemie (2,6 mmol/L), cetoză <i>Metabolic acidosis (pH 7,28); hypoglycemia (2,6 mmol/L), cetosis</i>
Pacientul 13 Patient 13	f	8 l 8 mo	Convulsii, letargie, hipotonie musculară, oboseală, retard general <i>Seizures, lethargy, muscular hypotonia, fatigue, general retardation</i>
Pacientul 14 Patient 14	m	13 a 13 yrs	Acidoză metabolică severă (pH 7,09-7,22), lactat crescut (5,12 mmol/L), hiperamonemie (110 μmol/L) <i>Severe metabolic acidosis (pH 7,09-7,22), high lactate level (5,12 mmol/L), hyperammonemia (110 μmol/L)</i>
Pacientul 15 Patient 15	m	3 a 3 yrs	Vome, dehidratare, hipotonie musculară, retard general <i>Vomiting, dehydration, muscular hypotonia, general retardation.</i>

Notă: Valori de referință: pH: 7,35-7,45; glicemie: 4,0-5,9 mmol/L; amoniac: 9-30 μmol/L; lactat: 0,7-2,1 mmol/L; m – masculin, f – feminin; a – ani, l – luni;
Note: Reference values; pH: 7,35-7,45; glucose: 4,0-5,9 mmol/L; ammonia: 9-30 μmol/L; lactate: 0,7-2,1 mmol/L; m – male, f – female; yrs – years, mo – months

acidoza metabolică, în 20% (n = 3) – hipoglicemie, în 46,6% (n = 7) – nivel ridicat al acidului lactic, iar valori crescute ale amoniacului le-au avut 20% (n = 3) din pacienți. Screening-ul metabolic extins a fost efectuat la 13 pacienți (86,66%). Toți pacienții descriși au fost supuși analizei cromatografice, iar cromatogramele obținute au fost sugestive pentru o eroare înăscută de metabolism în 4 cazuri (26,6%).

Rezultate anormale ale aminoacizilor plasmatici au fost observate la o fetiță de 2 luni (pacientul numărul 4) cu convulsii de la naștere, stare precomatoasă și stop respirator.

in order of severe acidosis, in 20% (n = 3) – hypoglycemia, in 46,6% (n = 7) – high lactate level and 20% (n = 3) of the children had high ammonia level. Metabolic extended screening has been performed in 13 patients (86,66%). The described patients were subjected to chromatographic analysis by HPLC and the obtained chromatograms were suggestive for an inborn error of metabolism in 4 cases (26,6%).

Abnormal results on plasma amino acids have been seen in patient number 4, a girl of 2 months old, whose main clinical conditions were seizures from birth, precomatous

Începând cu a treia zi de viață, copilul a început să dezvolte convulsii intratabile, apoi a intrat în comă timp de o lună. La electroencefalografie s-a observat discontinuitatea excesivă a activității cerebrale sub formă de suprimare a exploziei și separată în regiunea frontală cu accent pe unele ascuțite hipervoltate acute stâng izolate cu caracter epileptiform. Tomografia computerizată a arătat hidrocefalie cerebrală mixtă. În baza evoluției manifestărilor clinice, o EIM a fost suspectată. În acest context, au fost colectate fluide biologice (DBS, plasmă, urină, lichid cefalorahidian (LCR)). Analiza aminoacizilor a fost efectuată prin HPLC și cromatografie lichidă cu schimb ionic (Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie, Chișinău, Moldova) (Fig. 1).

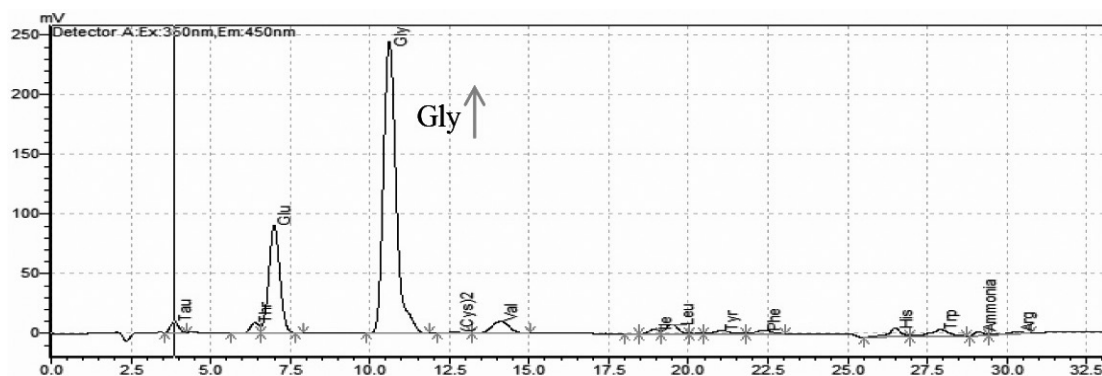


Fig. 1 Cromatograma profilului aminoacizilor plasmatici a pacientului numărul 4
Fig. 1 Plasma amino acid chromatogram of patient number 4 .

În rezultatul analizei cromatografice, a fost identificat nivel crescut al aminoacidului glicina în plasmă (*Gly* 544 $\mu\text{mol/L}$, valori de referință 70,72 – 256,36 $\mu\text{mol/L}$), fiind suggestive pentru o eroare înăscută a metabolismului *Gly* – Hiperglicinemie noncetotica (NKH). Biomarkerul biochimic al acestei patologii este raportul crescut al glicinei dintre LCR / plasmă, prin urmare, aminoacizii au fost testați și în LCR. Nivelul de *Gly* a fost, de asemenea, ridicat, depășind de 10 ori intervalele normale (valoare de referință: < 20 $\mu\text{mol/L}$), iar valoarea raportului glicinei în LCR / plasmă de 0,147 (normal < 0,02) a fost evident pentru NKH [17, 18]. Suplimentar, diagnosticul a fost consolidat de rezultatele screeningului metabolic extins (valorile glicinei – 1085,9 $\mu\text{mol/L}$ (valoare de referință: < 650,0 $\mu\text{mol/L}$), precum și cele primite în urma efectuării spectroscopiei RMN, identificându-se o cantitate mare de *Gly* în urină. Diagnosticul a fost confirmat, ca urmare a investigațiilor moleculare – genetice, prin identificarea a două mutații patologice în stare homozigotă în gena *GLDC*, asociate cu Hiperglicinemie noncetotică [OMIM 605899]. În consecință, tratamentul a fost individualizat în funcție de diagnosticul biochimic, iar terapia pacientului a inclus o dietă scăzută în *Gly* și administrarea de benzoat de sodiu 200 mg/kg/zi.

Un alt caz cu profilul anormal al aminoacizilor a fost pacientul numărul 9, o fetiță de 5 zile cu anamnezic familiar pentru Fenilketonurie (PKU), însă nu a fost efectuat diagnostic prenatal. Fratele mai mare a fost diagnosticat cu PKU în

state and respiratory arrest. From the third day of life, the child started to develop intractable seizures then she went into a coma for a month. On electroencephalography there was observed excessive discontinuity of cerebral activity in the form of burst-suppression pattern and separated in the frontal region with an emphasis on the left isolated acute hypervolted sharp waves of epileptiform character. Computed tomography scan showed cerebral mixed hydrocephalus.

Based on clinical manifestations and evolution, an IEM has been suspected. In this context, body fluids samples (DBS, plasma, urine, cerebrospinal fluid (CSF)) have been collected. Amino acids analysis in CSF, plasma and urine has been performed by HPLC (Fig. 1) and ion-exchange liquid

chromatography (Institute of Physiology and Sanocreatology, Chisinau, Moldova).

The obtained amino acid profile showed high level of glycine (*Gly*) in plasma (544 $\mu\text{mol/L}$; reference value 70,72 – 256,36 $\mu\text{mol/L}$), being suggestive for disorder of *Gly* metabolism – Nonketotic hyperglycinemia (NKH). It is known that the biochemical hallmark for this disease is the elevated glycine CSF / plasma ratio, so the amino acids analysis was performed in CSF. *Gly* level was also high, exceeding 10 fold above the normal ranges (reference value: < 20 $\mu\text{mol/L}$) and the *Gly* CSF / plasma ratio of 0,147 (normal < 0,02) was evident for NKH [17, 18]. Additionally, the data from newborn extended screening have been fortified the diagnosis (glycine values – 1085,9 $\mu\text{mol/L}$ (reference value: < 650,0 $\mu\text{mol/L}$) as well as the result from NMR spectroscopy, identifying high amount of *Gly* in the urine. The diagnosis was confirmed by two pathological mutations found in homozygous state in the *GLDC* gene during molecular investigations associated with Glycine encephalopathy [OMIM 605899]. Consequently, the treatment has been individualized according to the biochemical diagnosis. So, the patient therapy included a low glycine diet and the sodium benzoate 200 mg/kg/day administration.

Another case with abnormal amino acid profile was the patient number 9, a 5 days old girl who had a familial history for Phenylketonuria (PKU), but did not perform the prenatal diagnosis. The older brother has been diag-

cadrul Programului National de Screening din Moldova, 4 ani în urmă. În acest context, au fost recoltate probe de pete de sânge uscate de la nou-născută în a treia zi de viață, pentru diagnosticarea precoce a PKU. Rezultatele ei au fost anormale (fenilalanină > 14 mg/dl; valori de referință < 3 mg/dl), fiind sugestive pentru tulburări ale metabolismului fenilalaninei (*Phe*). Analiza aminoacizilor plasmatici a fost realizată pentru a confirma rezultatele anormale ale screening-ului dar și pentru a cuantifica concentrația exactă de *Phe* și tirozină (*Tyr*) în plasmă, cu scopul de a iniția și personaliza terapia prin dietă [14, 15]. Profilul aminoacizilor a prezentat un vârf foarte înalt la timpul de retenție - 22,5 minute, corespunzător aminoacidului *Phe* (Fig. 2).

nosed with PKU by Moldavian National Screening Program 4 years ago. In this context dried blood spots sample has been collected from the newborn girl in the third day of life, for early diagnosis of PKU. Her results were abnormal (Phenylalanine >14 mg/dl; reference values <3 mg/dl), being suggestive for disorders of phenylalanine (*Phe*) metabolism. Plasma amino acids analysis has been done to confirm abnormal newborn screening results and quantify the exact concentration of plasma *Phe* and tyrosine amino acid (*Tyr*), in order to initiate and personalize the diet-therapy [14, 15]. Amino acid profile showed a high peak at retention time - 22,5 minutes, corresponding with amino acid *Phe* (Fig. 2).

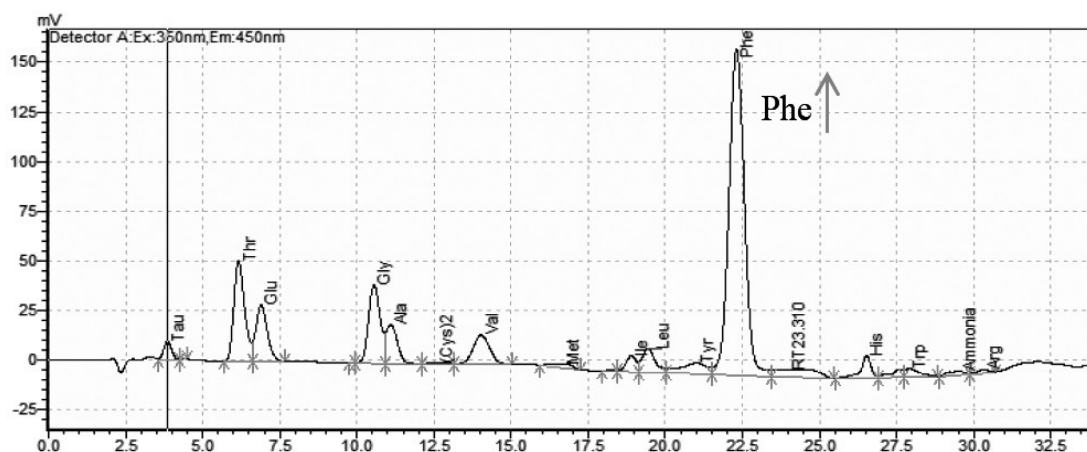


Fig. 2 Cromatograma profilului aminoacizilor plasmatici a pacientului numărul 9

Fig. 2 Plasma amino acid chromatogram of patient number 9. .

Analizând datele obținute, s-au detectat concentrații extrem de ridicate de *Phe* (1568 $\mu\text{mol/L}$; valori de referință 26,52-221 $\mu\text{mol/L}$), care confirmă tulburarea metabolismului fenilalaninei. În plus, *Tyr* a fost identificată în concentrație normală (92,4 $\mu\text{mol/L}$; valori de referință 26,52-123,76 $\mu\text{mol/L}$), dar raportul *Phe / Tyr* în jurul valorii de 17 este specific pentru forma clasică de PKU [17]. Suplimentar identificarea mutațiilor responsabile de boală prin secvențierea Sanger a genei *PAH* au confirmat diagnosticul de PKU.

Următorul copil raportat cu nivel anormal al profilului aminoacizilor a fost pacientul numărul 11, un băiat de 15 luni. Prezentările clinice au debutat la 15 luni de viață, manifestate prin crize de acidoză metabolică severă cu tahipnee, tulburări respiratorii și de alimentație, hipotonie, blefaroptoză, letargie, oboseală, alergii cutanate, sialoree și alopecie parțială (Tabelul 1). Având în vedere toate manifestările clinice, copilul a fost suspectat pentru o EIM. Analiza aminoacizilor plasmatici a fost efectuată prin HPLC în Institutul Mamei și Copilului și Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu". Ambele metode cromatografice au relevat concentrații ridicate de alanină în plasmă (*Ala* - 572 $\mu\text{mol/L}$, valori de referință: 79,56 - 424,32 $\mu\text{mol/L}$). Astfel nivelul ridicat de *Ala*, împreună cu valoarea raportului *Ala/Lys* de 6,8 sugerează o eroare metabolică cu implicare mitocondrială (Fig. 3). În urma screening-ului

Analyzing the obtained data, extremely high concentrations of *Phe* (1568 $\mu\text{mol/L}$; reference values 26.52-221 $\mu\text{mol/L}$) have been detected, that confirmed disorder of phenylalanine metabolism. Additionally, the tyrosine (*Tyr*) has been identified in normal concentration (92,4 $\mu\text{mol/L}$; reference values 26,52-123,76 $\mu\text{mol/L}$), but the *Phe / Tyr* ratio was around 17 and it was specific for classical form of PKU [17]. Genetic analysis of *PAH* gene, performed by Sanger sequencing confirmed the PKU disease.

The next reported child with abnormal level of amino acid profile was patient number 11, a 15 months old boy. The onset of clinical presentations appeared at 15 months of life, manifested by severe metabolic acidosis crisis with tachypnea, respiratory and feeding disorders, hypotonia, blepharoptosis, lethargy, fatigue, skin allergies, sialorrhea, and partial alopecia (Table 1). Considering all clinical manifestations, the child was suspected for an IEM. Plasma amino acids analysis has been performed by HPLC in Institute of Mother and Child and State University of Medicine and Pharmacy "Nicolae Testemițanu". Both HPLC analysis of plasma amino acids revealed high concentration of alanine (*Ala* - 572 $\mu\text{mol/L}$, reference values: 79.56 - 424.32 $\mu\text{mol/L}$), along with the value of the ratio *Ala/Lys* of 6,8 indicated the mitochondrial involvement (Fig. 3). Extended newborn screening by LC-MS/MS of DBS samples showed

metabolic extins prin LC-MS/MS a probelor DBS s-au identificat concentrații ridicate de propionil-L-carnitină ($C3 = 3.504 \mu\text{M/L}$, (valori de referință $< 2,7 \mu\text{M/L}$), hidroxi-izovaleric-L-carnitină ($C5OH = 2.317 \mu\text{M/L}$, (valori de referință $< 0,65 \mu\text{M/L}$) și raport ridicat de $C5OH/C0 = 0,076$ (valori de referință $< 0,035$) și $C5OH/C8 = 75,274$ (valori de referință < 13). În plus, prin efectuarea analizei acizilor organici în urină, au fost identificate niveluri ridicate de acid 3-hidroxiizovaleric, acid 3-hidroxiipropionic și acid 2-metilcitric, în prezența acidemiei piruvice și lactice. Nu au fost identificați corpi cetoni în urină.

high concentration of propionil-L-carnitina ($C3 = 3,504 \mu\text{M/L}$, (reference values $< 2,7 \mu\text{M/L}$), hydroxy isovaleric-L-carnitina ($C5OH = 2,317 \mu\text{M/L}$, (reference values $< 0,65 \mu\text{M/L}$), and high ratio of $C5OH/C0 = 0,076$ (reference values $< 0,035$), and $C5OH/C8 = 75,274$ (reference values < 13). Additionally, by performing organic acids analysis in urine, high levels of 3-hydroxyisovaleric acid, 3-hydroxypropionic acid and 2-methylcitric acid has been identified in the presence of pyruvic and lactic acidemia. No ketone bodies have been identified in the urine.

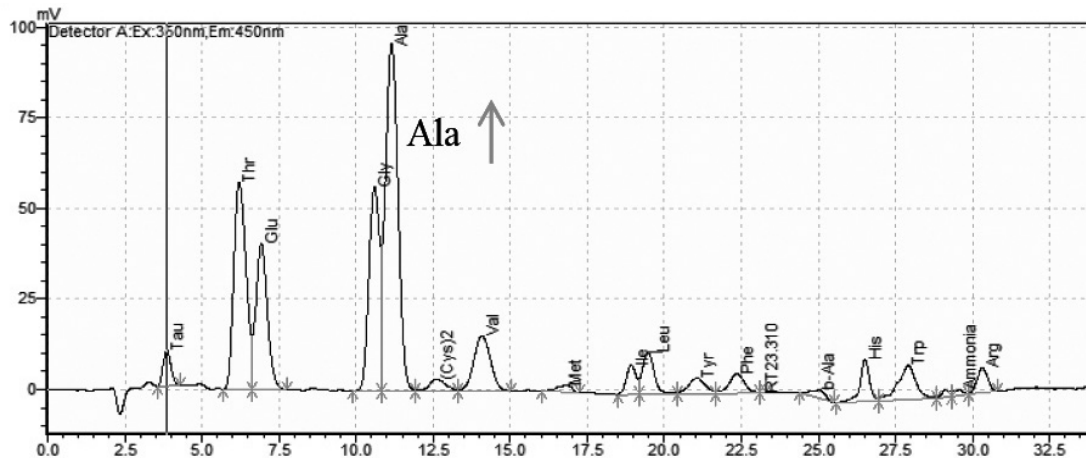


Fig. 3 Cromatograma profilului aminoacizilor plasmatici a pacientului numărul 11

Fig. 3 Plasma amino acid chromatogram of patient number 11.

În baza manifestărilor clinice și ale rezultatelor de laborator, a fost observată o asocieră cu tulburări ale metabolismului biotinei – Deficiență Multiplă de Carboxilază CoA (MCD), ușor tratată prin suplimentare orală cu biotină. În cazul pacientului raportat, acesta a primit 20 – 40 mg de biotină pe zi fără careva diete specifice. Pacientul a fost absolut receptiv la tratament, iar următoarea monitorizare a urinei a relevat dispariția metaboliților și starea clinică a fost îmbunătățită.

Ultimul pacient în cohorta analizată cu profil anormal al aminoacizilor plasmatici este cel cu numărul 14. La 13 ani, a fost internat cu acidoză metabolică severă (Tabelul 1), posibil declanșat de infectarea cu Covid-19 și aportul excesiv de proteine în timpul sărbătorilor de iarnă. Simptomele sale (mioglobinurie / rhabdomioliză, cetoză, hiperamoniemie, sindrom Reye (insuficiență hepatică fulminantă și leziuni ale sistemului nervos central)) în contextul istoriei personale (miopatie, oboseală, intoleranță la exerciții fizice, vome frecvente de la 7 ani) l-au făcut suspect de EIM. Pentru a elucida cauza anomaliilor, a fost efectuat un workup metabolic. În rezultatul analizei cromatografice prin HPLC s-a observat o concentrație crescută de Ala ($575 \mu\text{mol/L}$; valori de referință: $192-508 \mu\text{mol/L}$). În profilul acilcarnitinic s-au identificat valori anormale ale 3-hidroxiizovaleric-/2-metil-3-hidroxiubutiril-carnitinei ($C5OH$ -Carnitină - $0,840 \mu\text{M/L}$, valori de referință $< 0,65 \mu\text{M/L}$) și raport ridicat de $C5OH/C0$ ($0,037 \mu\text{M/L}$, referință

Based on clinical manifestations and laboratory data, there has been observed a strong suspicion for a disorder of biotin metabolism – Multiple CoA carboxylase deficiency (MCD), well treatable by oral biotin supplementation. In this case, the patient received 20-40 mg biotin per day, without any diet. The patient was well responsive to the treatment, the following urine monitoring revealed disappearance of toxic metabolites and the clinical state has been improved. The patient is continuing the biotin supplementation and is maintained in a good metabolic and health condition.

Patient number 14 was the last with abnormal amino acid profile in the analyzed cohort. At 13 years old, he was hospitalized with severe metabolic acidosis (Table 1), possibly triggered by Covid-19 infection and excessive protein intake during winter holidays. His symptoms (myoglobinuria / rhabdomyolysis, ketosis, hyperammonemia, Reye's - like syndrome (fulminant liver failure and central nervous system damage)) in the context of personal history (myopathy, fatigue, physical exercise intolerance, frequent vomiting started from 7 years old) made him suspected for an IEM. In order to elucidate the cause of these abnormalities, the metabolic workup has been performed. The HPLC analysis of plasma showed increased concentration of Ala ($575 \mu\text{mol/L}$; reference values: $192-508 \mu\text{mol/L}$). Acylcarnitine profile results revealed slightly increased concentration of 3-hydroxyisovaleryl-/2-methyl-3-hydroxybutyryl-carnitine ($C5OH$ -Carni-

(0,035 $\mu\text{M/L}$). Analiza acizilor organici din urină au evidențiat o concentrație ridicată de acid lactic, acid 3-hidroxiubutiric, acid 2-hidroxiubutiric, acid 3-hidroxi valerianic, acid 2-hidroxi valerianic și acid 3-metilglutaconic. Combinând toate aceste date se constată o suspjecție pentru o tulburare metabolică cu implicare mitocondrială. Secvențierea întregului exom nu a identificat nicio mutație patologică, astfel încât a fost recomandată secvențierea ADN-ului mitocondrial. Pacientul a primit biotină, la care a răspuns pozitiv, cu normalizarea profilului urinei și a datelor clinice.

Discuții

Cu toate că EIM pot apărea la diferite vârste, afectarea căilor metabolice ale aminoacizilor este prezentă de la naștere și se poate manifesta în primele zile de viață după naștere fiziologică normală sau mai târziu prin manifestări cronice nespecifice [11]. Decompensarea metabolică acută în perioada neonatală cauzată de acumularea de metaboliți toxici în organism poate fi prezentată prin acidoză metabolică severă (pH sangvin sub 7,35), alcaloză (pH sangvin peste 7,45), hipoglicemie, niveluri ridicate de amoniac și lactat [6, 19]. Pentru a detecta biomarkeri biochimici specifici asociați anumitor tipuri de EIM, au fost implementate metode avansate de diagnostic. Printre acestea, metoda cromatografică de obținere a profilului aminoacizilor joacă un rol crucial și necesită de a fi realizată la fiecare pacient cu suspjecție pentru EIM.

Cuantificarea aminoacizilor este un instrument ideal pentru diagnosticarea aminoacidopatiilor și poate oferi date complementare în vederea diagnosticării altor tipuri de EIM. Interpretarea profilului aminoacizilor se bazează nu numai pe nivelul anormal al unui singur aminoacid, dar implică și alți biomarkeri metabolici specifici, inclusiv relații între diferiți metaboliți (Tabelul 2) și corelația cu istoricul clinic al pacientului. Biomarkerii servesc ca indicatori ai proceselor biologice normale sau patologice; ei pot prezice, diagnostica, monitoriza și evalua severitatea unei boli. De exemplu, detectarea unui nivel ridicat de *Phe* în plasmă este asociată cu PKU [OMIM 261600], o maladie ereditară a metabolismului fenilalaninei, cauzată de mutații în gena *PAH* (aproximativ 98% cazuri) și, în cazuri rare, de mutații în genele implicate în biosinteza tetrahidrobiopterinei [19]. Alături de *Phe* crescută (concentrație > 120 $\mu\text{mol/L}$), raportul *Phe / Tyr* crescut (> 3) este un biomarker important pentru diagnosticul PKU, care poate fi utilizat pentru a face diferența între tipurile de PKU și hiperfenilalaninemia (HPA) [20]. Biomarkeri adiționali folosiți în diagnosticul PKU pot servi anumiți acizii organici urinari identificați în exces, ca fenilpiruvic, fenilacetic, fenilactic, 2-hidroxiifenilacetic și N-fenilacetilglutamic (Tabelul 2) [3]. La pacienții cu PKU se monitorizează cantitățile de *Phe* și *Tyr* în dinamică, pentru evaluarea evoluției bolii și asigurării unui control eficient asupra dietoterapiei.

Importanța biomarkerilor din spectrul aminoacizilor poate fi demonstrată și pe exemplul hiperglicinemiei noncetotice, cunoscută sub numele de encefalopatie glicinică. Fiind o aminoacidopatie, diagnosticul se bazează pe analiza aminoacizilor, care ar prezenta concentrații crescute a

tine - 0,840 $\mu\text{M/L}$, reference values < 0,65 $\mu\text{M/L}$) and high ratio of C5OH/C0 (0,037 $\mu\text{M/L}$, reference values < 0,035 $\mu\text{M/L}$). Urine organic acids revealed high concentration of lactic acid, 3-hydroxiubutiric acid, 2-hydroxiubutiric acid, 3-hydroxi valerianic acid, 2-hydroxi valerianic acid and 3-methylglutaconic acid. Combining all the data a possible presence of a disorder with mitochondrial involvement was suspected. Whole exome sequencing did not reveal any pathological mutation, so the mitochondrial DNA sequence was recommended. He responded well to biotin treatment with normalization of urine profile and clinical data as well.

Discussions

Despite to the fact that IEM may present at various ages, the disorder of amino acids pathway is present from birth and may be manifested the first days of life as deterioration after normal birth and delivery or later as nonspecific chronic manifestations [11]. Acute metabolic decompensation in the neonatal period may also present severe acidosis (blood pH below 7,35), alkalosis (blood pH above 7,45), hypoglycemia, high ammonia and lactate levels [6, 19] due to accumulation of toxic metabolites in the body. Advanced laboratory tests have been implemented in order to detect specific biochemical biomarkers associated with particular IEM. Among these tests amino acid analysis plays a crucial role and should be done in every patient with a suspected IEM.

Amino acids quantification is a perfect tool for diagnosis of aminoacidopathies and can offer complementary data for other types of IEM. The interpretation of amino acids profile is based not only on the abnormal level of a single amino acid, but rather involves other specific biomarkers including diagnostic ratios (Table 2) and correlation to the patient's clinical history. Biomarkers serve as measurable indicators of normal biological or pathological processes; they can predict, diagnose, monitor and assess the severity of a disease. For example, detection of high level of plasma *Phe* is associated with PKU [OMIM 261600], an inherited disorder of phenylalanine metabolism, caused by mutations in *PAH* gene (around 98% cases) and in rare cases by mutations in genes implicated in biosynthesis of tetrahydrobiopterin [19]. Along with elevated *Phe* (concentration > 120 $\mu\text{mol/L}$), an elevated *Phe / Tyr* ratio (> 3) is an important biomarker for the diagnosis of PKU, that can be used to differentiate between PKU and hyperphenylalaninemia (HPA) [20]. Additional biomarkers for PKU are obtained by performing urine organic acid analysis; patients with PKU will show elevations in phenylpyruvic, phenylacetic, phenyllactic, 2-hydroxyphenylacetic, and N-phenylacetylglutamic acids (Table 2) [3]. Individuals with PKU have *Phe* and *Tyr* routinely monitored, to ensure optimal dietary control of the disease. The importance of biomarkers from amino acids spectrum can be seen on example of Nonketotic hyperglycinemia, also known as glycine encephalopathy. As NKH is an aminoacidopatie, the diagnosis relies on amino acid analysis, which should reveal an elevation of glycine in body fluids (plasma, urine, and CSF). However, plasma glycine level may not be significantly increased in all cases due to diurnal variation and differences in dis-

Tabelul 2. Biomarkeri metabolici din spectrul aminoacizilor utilizați în diagnosticul EIM [3, 8, 21]
Table 2. Metabolic Biomarker from amino acids spectrum used in the diagnosis of IEM [3, 8, 21]

Aminoacidul implicat <i>Amino acid involved</i>	Biomarkeri adiționali <i>Additional biomarkers</i>	Maladii asociate <i>Associated disorders</i>
Valori excesiv crescute de lizină (U) <i>Lysine markedly elevated (U)</i>	Arginină, creștere moderată de ornitină (U), acid orotic (U) <i>Arginine, ornithine moderate increase (U), orotic acid (U)</i>	Intoleranță la proteinele lizinurice <i>Lysinuric protein intolerance</i>
Valori crescute de homocisteină (S, U) <i>High homocysteine (B, U)</i>	Homocisteină totală și metionină (S, U) <i>Total homocysteine and methionine (B, U)</i>	Homocisteinuria <i>Homocysteinuria</i>
Valori crescute de metionină (S) <i>High methionine (B)</i>	Homocistină plasmatică ușor crescută, S-adenosilhomocisteină (S), S-adenosilmetionină (S) <i>Mildly elevated total plasma homocysteine, S-adenosylhomocysteine, (B), S-adenosylmethionine (B)</i>	Deficit de S-adenozil-homocisteină-hidroxilază; Hipermetioninemia <i>S-Adenosyl- homocysteine- hydroxylase deficiency; Hypermethioninemia</i>
	S-adenosilmetionina (S) <i>S-adenosylmethionine (B)</i>	Deficitul de glicină-N-metiltransferază <i>Glycine-N- methyltransferase deficiency</i>
Valori crescute de valină, leucină, isoleucină (S) <i>High valine, leucine, isoleucine (B)</i>	Raportul plasmatic valină:izoleucină:leucină (3,5: 1: 2), 2-cetoacizi și 2-hidroxiacizi cu lanțul ramificat (U) <i>Plasma ratio of valine:isoleucine:leucine (3,5:1:2), branch chain 2-ketoacids and 2-hydroxyacids (U)</i>	Boala urinei cu sirop de arțar (MSUD) <i>Maple syrup urine disease (MSUD)</i>
Valori crescute de glicină (B, LCR, U) <i>High glycine (B, CSF, U)</i>	Creșterea raportului glicinei din LCR/plasmă <i>Increased CSF/plasma glycine ratio</i>	Hiperglicinemia necetotică <i>Nonketotic hyperglycinemia</i>
	Raportul Phe:Tyr (S), acizii fenilpiruvic, fenilactic, 2- hidroxifenilacetici (U) <i>Phe:Tyr ratio (B), phenylpyruvic, phenyllactic, 2- hydroxyphenylacetic acids (U)</i>	Fenilcetonurie / Hiperfenilalaninemie, <i>Phenylketonuria/ Hyperphenylalaninemia,</i>
Valori crescute de fenilalanină (S) <i>High phenylalanine (B)</i>	Biopterină scăzută, neopterină scăzută sau ridicată (U) <i>Low biopterin, low or high neopterin (U)</i>	Defectul biosintezei cofactorului biopterinei <i>Defect of biopterin cofactor biosynthesis</i>
	Neopterină și primapterină ridicate (U) <i>High neopterin and primapterin (U)</i>	Defect al regenerării cofactorului biopterinei <i>Defect of biopterin cofactor regeneration</i>
	Succinilacetonă (DBS, U), acizi 4-hidroxi-fenilpiruvici, 4-hidroxi-fenilactici (U) <i>Succinylacetone (DBS, U), 4-hydroxyphenylpyruvic, 4-hydroxyphenyllactic acids (U)</i>	Tirozinemia tip I <i>Tyrosinemia I</i>
Valori crescute de tirozină (S) <i>High tyrosine (B)</i>	Acizi 4-hidroxi-fenilpiruvici, 4-hidroxi-fenilactici (U) <i>4-hydroxyphenylpyruvic, 4-hydroxy-phenyllactic acids (U)</i>	Tirozinemia tip II <i>Tyrosinemia II</i>
	Acizi 4-hidroxi-fenilpiruvici, 4-hidroxi-fenilactici (U) <i>4-hydroxyphenylpyruvic, 4-hydroxyphenyllactic acids (U)</i>	Tirozinemia tip III <i>Tyrosinemia III</i>
Valori crescute de alanină (S) <i>High alanine (B)</i>	Raportul lactat : piruvat înalt, nivel crescut de lactat, acidoză <i>High lactic:pyruvate ratio, high lactate level, acidosis</i>	Tulburări mitocondriale <i>Mitochondrial disorders</i>
Valori crescute de prolină (U) <i>High proline (U)</i>	5-carboxilat de pirolină ridicată <i>High pyrroline 5-carboxylate</i>	Deficitul de prolin oxidază / Hiperprolinemia I <i>Proline oxidase deficiency/ Hyperprolinemia I</i>
Valori crescute de ornitină (S, U) <i>High ornithine (B, U)</i>	Valori crescute de homocitrulină (U) și amoniac (S) <i>High homocitrulline (U) and ammonia (B)</i>	Sindromul HHH <i>HHH syndrome</i>

Notă: S – sânge; U – urină; LCR – lichid cefalorahidian; HHH – Hiperornitinemie hiperamonemie homocitrullinemie
 Note: B – blood; U – urine; CSF – cerebrospinal fluid; HHH – Hyperornithinemia hyperammonemia- homocitrullinemia.

glicinei în fluidele biologice (plasmă, urină și LCR). Nivelul glicinei plasmatică, din cauza variației diurne și a diferențelor de severitatea a bolii poate să nu fie semnificativ crescut în toate cazurile de NKH, dar glicina este întotdeauna crescută în LCR. Din acest motiv, LCR se recomandă de fi colectat în orice caz când convulsiile intractabile sunt prezente de la naștere. Prin urmare, pentru diagnosticarea NKH, raportul crescut de glicină în LCR / plasmă poate fi

ease severity, but glycine is always elevated in CSF. CSF collection is recommended in any case when the intractable seizures are present in the patient from the birth, for the following metabolic investigations. Therefore, the elevated CSF / plasma ratio, usually greater than 0.08 in classical NKH, and greater than 0.04 in atypical NKH can be used for diagnosis of NKH [21].

In case of alanine, high concentration of this amino acid

utilizat. Valori mai mari de 0,08 sunt caracteristice pentru NKH clasică iar mai mari de 0,04 pentru NKH atipică [21].

În cazul alaninei, concentrația ridicată al acestui aminoacid nu este direct asociată cu patologia, ci acționează ca biomarker secundar în diferite tulburări. Este interesant faptul că nivelurile crescute de *Ala* (> 450 μmol/L) sunt sugestive pentru o disfuncție mitocondrială, dar este nespecifică și nu este un marker de diagnostic [21].

În acest context, interpretarea rezultatelor testelor metabolice de laborator trebuie să fie privită în complex cu toți biomarkerii disponibili. De asemenea, înainte de analiză și interpretarea rezultatelor, variabilele pre-analitice, cum ar fi dieta și tratamentele medicamentoase, ar trebui considerate pentru a evita rezultatele fals pozitive [22]. De exemplu, anumite medicamente, cum ar fi unele antidepresive și antiepileptice, pot produce o creștere a glicinei, care ar putea fi diagnosticată greșit ca hiperglicemie necetotică [3]. O dietă bogată în proteine duce la excreția crescută a β alaninei și a 1-metilhistidinei, prin urmare se recomandă recoltarea de sânge destinată analizei aminoacizilor după foame peste noapte. Prin contrast, un aport scăzut de proteine sau catabolism crescut datorită vomelor sau foamei poate duce la creșteri ale aminoacizilor cu lanț ramificat (BCAA), care pot imita boala urinei cu sirop de arțar (MSUD) [21]. Colectarea și stocarea fluidelor biologice pot de asemenea influența nivelul aminoacizilor. De exemplu, o probă hemolizată poate duce la scăderea argininei cu creșterea simultană a ornitinei datorită activității arginazei hematiilor și la o creștere a taurinei eliberate din leucocite și trombocite. Per total, în timpul depozitării prelungite a probelor glutamina și asparagina scad în timp ce acizii glutamici și aspartici cresc simultan [3]. Alți factori, cum ar fi contaminarea bacteriană urinară, pot modifica semnificativ profilul aminoacizilor urinari [23]. Având în vedere toate acestea, interpretarea completă a profilului aminoacizilor ar trebui făcută în raport cu istoricul clinic al pacientului.

Concluzii

În prezentul studiu, peste 27% dintre pacienți au prezentat devieri în profilul aminoacizilor. Diagnosticul de Fenilketonurie și Hiperglicemie noncetotică a fost stabilit la nivel biochimic și genetic. Concentrația crescută de *Ala* reprezintă un biomarker pentru o patologie metabolică cu implicare mitocondrială. În baza workup-ului metabolic efectuat, toți pacienții raportați urmează un tratament cu rezultat pozitiv. Diagnosticul precoce și precis al EIM este esențial pentru sănătatea pe termen lung ai subiecților afectați.

Declarația de conflict de interese

Autorii declară lipsa conflictului de natură financiară sau nonfinanciară, în legătură cu cercetarea sau publicația în cauză.

Contribuția autorilor

VH, CB au elaborat ipoteza și designul studiului. NU, DB au acumulat materialul primar, au selectat bacienții în baza criteriilor de includere și excludere. EE, CD și AN au avut o contribuție intelectuală semnificativă în interpretarea datelor și discutarea rezultatelor. NU a revizuit critic manuscrisul. Toți autorii au citit și aprobat versiunea finală a manuscrisului.

is not directly associated with pathology but acts as secondary biomarker in different disorders. It is interesting that elevated *Ala* levels (> 450 μmol/L) are suggestive for a mitochondrial dysfunction, but it is nonspecific and not diagnostic marker [21].

In this context interpretation of results from metabolic laboratory data must be complex, with regard to all available biomarkers. Likewise, prior to the analysis and results interpretation, pre-analytical variables such as a dietary status and medication treatments should be taken into account in order to avoid false positive results [22]. For example, certain drugs, including some antidepressants and antiepileptics, can produce an elevation in glycine, which could be misdiagnosed as nonketotic hyperglycinemia [3]. A diet rich in proteins leads to increased excretion of β alanine and 1-methylhistidine, thus blood collection intended for amino acids analysis is recommended after overnight fasting. By contrast, a decreased protein intake or increased catabolism due to vomiting or fasting can result in elevations of branched chain amino acids (BCAA), potentially mimicking Maple Syrup Urine Disease (MSUD) [21]. The body fluids collection and storage may influence the amino acids level as well. As example, a hemolyzed sample may lead to the decrease of arginine with simultaneous increase of ornithine due to red blood cells arginase activity, and an increase in taurine that released from leukocytes and platelets. Overall, during a prolong sample storage glutamine and asparagine decrease whereas glutamic and aspartic acids increase simultaneously [3]. Other factors such as urinary bacterial contamination can significantly alter urinary amino acids profile [23]. Regarding all this, a complete interpretation of an amino acid profile should be made in light of the patient's clinical and medical history.

Conclusions

In our study, over 27% of patients showed abnormalities in amino acid profile. The diagnosis of Phenylketonuria and Non-ketotic hyperglycinemia has been established at the biochemical and genetic level. Elevated concentration of *Ala* represents a biomarker for a metabolic pathology with mitochondrial involved. Based on performed metabolic work-up, all reported patients are on treatment with positive outcome. The early and precise diagnosis of IEM is essential for the long-term health of affected subjects.

Declaration of conflict of interest

Authors declare lack of any financial or non-financial conflict.

Authors' contribution

VH, CB elaborated the hypothesis and design of the study. NU, DB gathered primary material, selected the patients according to inclusion and exclusion criteria. EE, CD and AN had a significant contribution in the analysis performing and interpretation of the data. NU revised the manuscript critically. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

Mulțumiri

Isabela Tarcomnicu, Danae Stambouli de la Laboratorul Medical CytoGenomic, București, România pentru realizarea screening-ului metabolic extins din pete de sânge uscate prin cromatografie lichidă cu spectrometrie de masă (LC-MS/MS);

Svetlana Garaeva, Galina Postolati de la Institutul de Fiziologie și Sanocreatologie al Academiei de Științe din Moldova pentru cuantificarea aminoacizilor prin cromatografie lichidă de schimb ionic.

Acknowledgment

Isabela Tarcomnicu, Danae Stambouli from CytoGenomic Medical Laboratory, Bucharest, Romania for performing metabolic extended screening from dried blood spots by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS);

Svetlana Garaeva, Galina Postolati from Institute of Physiology and Sanocreatology of Academy of Science of Moldova, Chisinau, Moldova for performing ion-exchange liquid chromatography.

Referințe / references

- Ușurelu N. Era Erorilor Înăscute de Metabolism în Moldova, *Bul. Perinatol.*, 2016; 1(69), 54–58.
- Ferreira C. R., Van Karnebeek C. D., Vockley J., Blau N., A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med.*, 2019; 1(21), 102–106.
- Sandlers Y., Amino Acids Profiling for the Diagnosis of Metabolic Disorders. *Biochemical Testing-Clinical Correlation and Diagnosis*, 2019.
- Wasim M., Awan F. R., Khan H. N., Tawab A., Iqbal M., Ayesha H., Aminoacidopathies: Prevalence, Etiology, Screening, and Treatment Options. *Biochem. Genet.*, 2018; 1(56), 7–21.
- Scaturro G., Sanfilippo C., Piccione C., Piro E., Giuffrè M., Corsello G. Newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: past, present and future. *Pediatr Med Chir.*, 2013; 35(3), 105–109.
- Waters D., Adeloye D., Woolham D., Wastnedge E., Patel S., Rudan I., Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: A systematic analysis of the evidence. *J. Glob. Health*, 2018; 2(8).
- Wertheim-Tysarowska K., Gos M., Sykut-Cegielska J., Bal J. Genetic analysis in inherited metabolic disorders--from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives. *Dev. period Med.*, 2015; 4(19), 413–431.
- Ezgu F. Inborn Errors of Metabolism. *Adv Clin Chem.*, 2016; 1(73), 195–250.
- Ușurelu N., Introduction into Inborn Errors of Metabolism. *Bul. Perinatol.*, 2020; 1(86), 7–11.
- Vernon H. J., Inborn errors of metabolism: Advances in diagnosis and therapy. *JAMA Pediatr.*, 2015; 8(169), 778–782.
- Ismail I. T., Showalter M. R., Fiehn O. Inborn Errors of Metabolism in the Era of Untargeted Metabolomics and Lipidomics. *Metabolites*, 2019; 9(242), 1–25.
- Zschocke J., Hoffman G. F., *Vademecum Metabolicum*, 3rd Edition. *Milupa Metab.*, 2011; p. 175.
- Krieger I., Winbaum E. S., Eisenbrey A. B. Cerebrospinal fluid glycine in nonketotic hyperglycinemia. Effect of treatment with sodium benzoate and a ventricular shunt. *Metabolism*, 1977; 5(26), 517–524.
- Swanson M. A., Coughlin C. R. *et al.* Biochemical and molecular predictors for prognosis in nonketotic hyperglycinemia. *Ann. Neurol.*, 2015; 4(78), 606–618.
- Ușurelu N., Țurea V, Ușurelu O, Sacară V, Gavriluc A. Fenilcetonuria: consultul medico-genetic, dietoterapia, integrarea socială (ghid practic), 2008; 33–51.
- Van Wegberg A. M. J. *et al.* The complete European guidelines on phenylketonuria: Diagnosis and treatment. *Orphanet J. Rare Dis.*, 2017; 1(12), 1–56.
- Sharman R., Sullivan K., Young R., McGill J. A preliminary investigation of the role of the Phenylalanyne:Tyrosine ratio in children with early and continuously treated Phenylketonuria: Toward identification of ‘Safe’ levels. *Dev. Neuropsychol.*, 2010; 1(35), 57–65.
- Levy P. A. Inborn errors of metabolism: Part 1: Overview. *Pediatr. Rev.*, 2009; 4(30), 131–138.
- Tansek M. Z., Groselj U., Angelkova N., Anton D., Baric I., Djordjevic M.. Phenylketonuria screening and management in southeastern Europe – survey results from 11 countries. *Orphanet J Rare Dis.* 2015; 10(1), 1–7.
- Eastman J. W., Sherwin J. E., Wong R., Liao C. L., Currier R. J., Lorey F., Cunningham G. Use of the phenylalanine:tyrosine ratio to test newborns for phenylketonuria in a large public health screening programme. *J Med Screen.* 2000; 7(3), 131–135.
- Garg U., Smith L. D. Biomarkers in Inborn Errors of Metabolism. 2017.
- Milsom J. P., Morgan M. Y., Sherlock S. Factors affecting plasma amino acid concentrations in control subjects. *Metabolism*, 1979; 4(28), 313–319.
- [23] Vidler J., Wilcken B. Prevalence of unsuspected urinary bacterial contamination: Effects of screening tests for detection of inborn errors of metabolism. *Clin. Chim. Acta*, 1978; 1(82), 173–178, 1978.

ORCID ID autorului / Authors's ORCID ID:

Victoria Hlistun - <https://orcid.org/0000-0002-8563-3418>

Egor Efremov - <https://orcid.org/0000-0002-4544-353X>

Daniela Blaniță - <https://orcid.org/0000-0001-7736-3406>

Chiril Boiciuc - <https://orcid.org/0000-0002-7273-2492>

Calin Deleanu - <https://orcid.org/0000-0001-8206-5227>

Alina Nicolescu - <https://orcid.org/0000-0001-7022-8893>

Natalia Usurelu - <https://orcid.org/0000-0001-8685-393>