

Mojca Žerjav Tanšek¹, Tina Slabe²

Presejalni testi novorojenčkov za prirojene bolezni presnove

Newborn Screening for Inherited Metabolic Diseases

IZVLEČEK

KLJUČNE BESEDE: presejalni testi, novorojenček, prirojene bolezni presnove

Prispevek opisuje preteklost in sedanost presejalnih testov pri novorojenčkih v Evropi in v Sloveniji, predvsem na področju prirojenih bolezni presnove. Nova laboratorijska metoda tandemске masne spektrometrije je omogočila hitro in zanesljivo določanje večjega števila presnovkov v suhem vzorcu krvi. Možnost razširjenega testiranja za več 10 različnih prirojenih bolezni presnove brez pomembnejših dodatnih stroškov ne ustreza več strogim začetnim temeljnim načelom presejanja za zgodnje odkrivanje bolezni. Spremenjena merila uvajanja presejalnih testov z nedorečenimi pogoji uporabe pridobljenih podatkov in obravnave bolnikov bodo v prihodnosti zahtevala dobro načrtovane raziskave samega postopka presejanja in sledenje vseh odkritih bolnikov, da bomo lahko znanstveno utemeljili prednosti in pomanjkljivosti razširjenega testiranja novorojenčkov. V Sloveniji v zadnjih 30 letih na področju presejalnih testov za prirojene bolezni presnove ni bilo nobenih sprememb. Priporočila Evropske skupnosti glede širitve programa presejanja naj bi bila kmalu objavljena, kar bo dodatna spodbuda Sloveniji v načrtovanju sodobnega sistema presejalnih programov novorojenčkov.

175

ABSTRACT

KEY WORDS: newborn, screening, inherited metabolic disease

The article presents the history and the present situation regarding newborn screening of inherited metabolic diseases in Europe and Slovenia. Tandem mass spectrometry has become a technique with great potential and the benefit of finding many different analytes in a dry blood spot. For the first time in neonatal screening, multiple diseases could be diagnosed simultaneously from the same sample at virtually no additional cost, but the program is not in agreement with the first recommendations for newborn screening. Because of the many open questions related to expanded screening, ranging from data assessment to clinical treatment, it is especially important that scientific follow-up will be provided throughout the process of newborn screening. Slovenia has not changed the newborn screening program of inherited metabolic diseases for the last 30 years. European recommendations for the expanded newborn screening are expected and they should encourage the improvements in Slovenian newborn screening program.

¹ Mag. Mojca Žerjav Tanšek, dr. med., Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in presnovne bolezni, Pediatrična klinika, Bohoričeva ulica 20, 1000 Ljubljana; mojca.zerjav-tansek@mf.uni-lj.si

² Martina Slabe, dr. med., Klinični oddelek za perinatologijo, Ginekološka klinika, Šlajmerjeva ulica 3, 1000 Ljubljana

ZGODOVINA IN RAZVOJ PRESEJANJA ZA PRIROJENE BOLEZNI PRESNOVE

Prvo presejalno testiranje novorojenčkov se je v razvitem svetu začelo v letih 1962/1963 z uvedbo Guthrijevega testa za odkrivanje fenilketonurije (1). Poleg same metode bakterijske inhibicije je bil zelo pomemben sam način odvzema vzorca. Odvzem krvi na filter papir je do danes ostal temelj vseh presejalnih testov zaradi enostavnosti, obstojnosti in preprostega transporta.

Po začetkih presejanja za fenilketonurijo je bila v 70. letih prejšnjega stoletja v testiranje uvrščena tudi kongenitalna hipotiroza, saj v celoti izpolnjuje pogoje za uspešen presejalni test novorojenčkov. Danes skoraj vse evropske države s 100% pokritostjo testirajo za ti dve bolezni, katerih incidenca v Evropi je med 1:3.000 do 1:30.000 za fenilketonurijo in 1:1.300 do 1:13.000 za kongenitalno hipotirozo (2). V naslednjih desetletjih so posamezne evropske države vključile v presejalne teste dodatne laboratorijske preiskave za določanje še drugih bolezni (število držav s testom v oklepaju): kongenitalno adrenalno hiperplazijo (12), cistično fibrozo (6), galaktozemijo (7) in pomanjkanje biotinidaze (6 držav) (3).

Danes ima že več evropskih držav razširjeno presejalno testiranje novorojenčkov z metodo tandemске masne spektrometrije z elektrorazpršilno ionizacijo (angl. *electrospray ionization tandem mass spectrometry*, ESI-MS/MS) (Avstrija, Belgija, Danska, Nemčija, Nizozemska, Poljska, Portugalska, Španija, Švica), kjer lahko v enem vzorcu krvi določimo več kot 50 različnih presnovkov (2). Prva pilotna raziskava se je začela v letu 1998 v Nemčiji, večina držav pa je uvedla metodo po letu 2002 (4). Število iskanih bolezni s to metodo je med državami zelo različno – nekatere presejajo le za dve bolezni (npr. fenilketonurijo in pomanjkanje srednje verižne acil-CoA-dehidrogenaze v Švici), druge pa tudi za 20 različnih bolezni (npr. Avstrija) (3, 5). Število rojstev, ki jih obravnava en center, je 18.000–77.000 (3).

Glede na veliko občutljivost in ločljivost metode pri določanju koncentracij številnih metabolitov v vzorcu na filterskem papirju je pristop laboratorija lahko različno selekti-

ven (6). Govorimo lahko o usmerjenem pristopu: pri laboratorijskem odčitavanju sporočajo le strogo omejeno število rezultatov, ostalih pa laboratorij ne javi. Pri t. i. neusmerjeni analizi pa sporočajo vse bolezensko spremenjene vrednosti metabolitov, ki jih aparat lahko izmeri, tudi če je pomembnost še nejasna in dolgoročni vpliv na zdravje še vprašljiv oz. premalo raziskan. Različne države imajo različne pristope: v Nemčiji sporočajo le vnaprej dogovorjeno število izmerjenih presnovkov, ostale je ne glede na bolezenski izvid prepovedano sporočati in bi morali izvid uničiti. V ZDA vse dodatne bolezenske rezultate opredelijo kot sekundarno tarčo in jih sporočajo (določajo do 29 primarnih tarčnih izvidov ter do 25 sekundarnih), na Nizozemskem jih shranijo in pokažejo le na uradno zahtevo, v Angliji pa je že samo računalniško odčitavanje izvidov omejeno le na obe prirojene bolezni presnove (VBP), opredeljeni v nacionalnem programu (6, 7). V ZDA so mnoge zvezne države del razširjenega presejanja privzele kot dodatno možnost k obveznim presejalnim testom in ga obravnavajo kot dodaten vzorec in dodaten strošek (7, 8).

Čeprav je teoretično možno presejalno določiti indikatorje za adrenalno hiperplazijo in galaktozemijo z ESI-MS/MS-tehnologijo, pa te običajno ne uporabljajo in večinoma laboratoriji uporabljajo ločene teste (9). Presejanje za pomanjkanje biotinidaze, hipotirozo in cistično fibrozo pa je v celoti opravljeno z drugimi laboratorijskimi metodami in ne z MS/MS (3).

POGOSTNOST PRIROJENIH BOLEZNI PRESNOVE

Statistični podatki o pogostnosti VBP glede na rezultate presejanja se med državami nekoliko razlikujejo, vendar pa kažejo bistveno višje število bolnikov, kot jih je imelo diagnozo na osnovi kliničnih znakov (3). Neonatalno presejanje namreč izpostavi bolnike, ki bi sicer bili prepozno odkriti ali pa prava diagnoza sploh ne bi bila ugotovljena, obenem pa odkrije tudi lažje oblike bolezni. Najdemo tudi nekatere VBP, ki v veliki meri ostanejo v življenju brez simptomov, na primer histidinemija, pomanjkanje kratkoverižne acil-CoA-dehidrogenaze in citrulinemija tipa I, čeprav je bilo

pri slednji objavljenih nekaj primerov presnovnega iztirjenja asimptomatskih bolnic ob in po porodu (10). Avstrijski zbrani rezultati presejanja 15 različnih prirojenih boleznih presnove z ESI-MS/MS so pokazali skupno pojavnost 1 na 4000 živorojenih, kar pomeni za to državo 114 novih bolnikov v 5 letih (3). Tudi na Tajvanu so številke podobne, saj odkrije enega novorojenčka z dokazano VBP na 6.000 živorojenih (11).

MERILO ZA VKLJUČITEV PRIROJENIH BOLEZNI PRESNOVE V PRESEJALNI PROGRAM

Trenutni nabor presejalnih testov v državnih programih že dolgo ne sledi temeljnim načelom za uvedbo presejanja novorojenčkov, kot so bili postavljeni daljnega leta 1968 (12). Nekatere države v Evropski uniji, ki so se odločale za razširjeno neonatalno presejanje, so kot utemeljitve upoštevale naslednja načela:

- zanesljivost laboratorijske diagnostike (specifičnost, občutljivost metode in nizka lažna pozitivnost testa),
- razpoložljivo zdravljenje, ki ob pravočasni uvedbi za bolnika prinaša veliko korist in ga prej ni bilo,
- razširjenje števila iskanih boleznih zaradi uporabe iste metode ne podraži bistveno procesa presejanja in
- za vodenje ugotovljenih novih bolnikov je na voljo ustrezno organizirana in strokovno usposobljena zdravstvena mreža.

V Veliki Britaniji so se odločili za večjo pilotno raziskavo razširjenega presejanja za dodatnih pet boleznih, ki bo natančno ocenila ustreznosti laboratorijske metode, ekonomske analize, rezultate zdravljenja in sledenja odkritih bolnikov, razpoložljivost strokovnega osebja ter kakovost celotnega procesa. Šele na osnovi teh rezultatov bo podana odločitev razširitve testov (13).

V zadnjih dveh letih Evropska unija (EU) vodi projekt ovrednotenja neonatalnega presejanja v vseh državah članicah s ciljem, da bi se strnile vse izkušnje, ocenilo trenutno stanje v presejanju v državah članicah in izoblikovala priporočila postopkov in obsega presejanja za celotno področje EU. S poeno-

tenjem postopkov in z natančnim sledenjem vseh ugotovljenih bolnikov bi lahko uspešno ocenili strokovno vrednost in stroške projekta razširjenega neonatalnega presejanja (14). V prihodnosti se bo treba podobno opredeliti tudi glede genetskega presejanja novorojenčkov (posredna razširitev diagnostike na možno bolezen pri starših v primeru dominantnih dedovanj, prenašalci boleznih) (15).

ETIČNE IN SOCIALNE RAZSEŽNOSTI NEONATALNEGA PRESEJANJA NA PRIROJENE BOLEZNI PRESNOVE

Temelj uvedbe presejalnih testov je predpostavka, da naj prinašajo največjo možno dobrobit ob najmanjši škodi. Starši naj bi bili že pred odvzemom vzorca krvi novorojenčku ustno in/ali pisno obveščeni o postopku in namenu presejanja (lahko tudi le z informacijo o internetni strani, kjer so zbrani podatki o programu neonatalnega presejanja) (5). V večini evropskih držav pred odvzemom vzorca tudi podpišejo obveščeni pristanek, ki ponekod vključuje tudi pristanek za hranjenje preostalih vzorcev po opravljenem testu (16). Slovenija je ena redkih držav, ki tega postopka ne izvaja, čeprav je vključitev otroka v presejalno testiranje zakonsko obvezno.

Pozitivni izvid presejanja ni diagnoza boleznih in zahteva posebej še pri VBP dodatne diagnostične postopke, ki morajo biti jasno opredeljeni, hitri (da se pravočasno uvede zdravljenje), opravljeni v specializiranem medicinskem centru z dobrim znanjem o vseh vidikih VBP, ki lahko daje staršem ustrezne informacije o bolezni, jih v celoti pouči o vodenju doma (dietni principi, protokoli preprečevanja katabolizma, navodila ukrepanja za t. i. »bolne dneve« ipd.) in bolnika kasneje strokovno vodi. Obravnava naj bi vključila v izobraževanje tudi otrokovega pediatra/ družinskega zdravnika in druge pomembnejše osebe v otrokovem okolju (16).

Vsak državni program presejanja mora imeti tudi stalno in dobro organizirano strokovno usposabljanje vsega udeleženega zdravstvenega osebja, kar je še posebej pomembno ob širjenju programa.

PRESEJALNI TESTI NOVOROJENČKOV V SLOVENIJI

V Sloveniji že skoraj 30 let izvajamo le dva presejalna testa: za kongenitalno hipotirozo z okvirno pojavnostjo 1/3.500 novorojenčkov ter fenilketonurijo s pojavnostjo, ki je bila ocenjena na 1/7.500 (17, 18). Zaradi znižanja mejne koncentracije serumskega fenilalanina za uvedbo diete (od 0,6 mmol/l na 0,4 mmol/l) v zadnjem desetletju opažamo porast števila zdravljenih otrok s hiperfenilalaninemijo (19). Vzporedno je manj novorojenčkov s klasično fenilketonurijo, kar pa je lahko posledica zgodnje uvedbe diete, saj vrednost fenilalanina v krvi ne doseže koncentracije 1,2 mmol/l, kar je temeljni kriterij diagnoze klasične fenilketonurije (20).

Od leta 1992 poteka laboratorijska diagnostika presejalnih testov za fenilketonurijo na Kliniki za nuklearno medicino Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana (UKCL) s fluorometrično metodo na madežu suhe krvi na filtrskem papirju. Krvni vzorec v porodnišnicah odvzamejo 3.–5. dan po rojstvu.

Metoda je kvantitativna, vrednosti fenilalanina, višje od 0,12 mmol/l oz. v mejnem območju višje od 0,085 mmol/l (normalna vrednost fenilalanina s fluorometrično metodo je pod 0,12 mmol/l, mejne vrednosti 0,085–0,12 mmol/l), pa pomenijo ponovitev meritve oz. klicanje novorojenčka na ponovni odvzem krvi. Novorojenčku v diagnostično potrditev odvezamo venosko kri na Pediatrični kliniki UKCL in ob vrednosti fenilalanina nad 0,4 mmol/l takoj uvedemo dietno zdravljenje.

Presejanje za hipotirozo se prav tako izvaja na Kliniki za nuklearno medicino, kjer

izmerijo koncentracijo tirotropnega hormona (TSH) v krvi na filtrskem papirju. Trenutno uporabljajo kvantitativno fluorometrično metodo z uporabo monoklonskih protiteles, TSH nad 20 mE/l oziroma nad 6,5 mE/l (mejne vrednosti 6,5–20 mE/l) pa predstavlja povišano vrednost in zahteva dodatno opredelitev stanja s ponovnim odvzemom krvi.

Odstotek ponovnega klicanja za odvzem na filtrski papir in ponovitev presejanja ne presega 0,12 % pri merjenju TSH in 0,28 % pri merjenju fenilalanina (podatki Klinike za nuklearno medicino v letih od 2002 do 2007) (20). Podatki iz Porodnišnice Ljubljana pa kažejo, da je odstotek ponovnega klicanja pri merjenju TSH oz. fenilalanina 0,33 % oz. 0,93 % (od 31.903 novorojenčkov jih je bilo ponovno klicanih 106 za TSH oz. 297 za fenilalanin). Pomemben vzrok za ponovitev presejanja je tudi tehnično neustrezno odvzet vzorec (s krvjo premalo prepojen filtrski papir, premalo posušen vzorec krvi, nanos krvi s pripomočkom (kapilaro)) in dosega 0,55 % ponovno klicanih novorojenčkov (podatki Porodnišnice Ljubljana v letih 2006–2010).

Vsi otroci, pri katerih je dokazana fenilketonurija ali kongenitalna hipotiroza, se strokovno vodijo na Pediatrični kliniki v Ljubljani, zdravljenje pa je uvedeno v prvih 14 dneh po rojstvu.

ZAKLJUČEK

Glede na zelo skromno število presejalnih testov v Sloveniji ni pričakovati, da bi lahko katerega od obeh opustili, saj sta še vedno temelj presejanja. Presejanje z metodo ESI-MS/MS vključuje tudi fenilketonurijo, medtem ko bi za določanje TSH morali obdržati že uveljavljeno metodo.

LITERATURA

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963; 32: 338–43.
2. Loeber JG. Neonatal screening in Europe: the situation in 2004. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30 (4): 430–8. Dosegljivo na: <http://isns.napoleon.ch/upload/dokumente/NeonatalscreeningEurope2004-JIMD.pdf>
3. Bodamer OA, Hoffmann GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inherit Metab Dis*. 2007; 30 (4): 439–44.

4. Roscher A, Liebl B, Fingerhut R, et al. Prospective Study of MS-MS newborn screening in Bavaria, Germany. Interim Results. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23 Suppl 1: 4.
5. Neugeborenen screening [internet]. Österreichisches Programm zur Früherfassung von angeborenen Stoffwechselerkrankungen [citirano 2011 Feb 10]. Dosegljivo na: <http://www.neugeborenencreening.at/index.html>
6. Pollitt PJ. Introducing new screens: Why are we all doing different things? *J Inherit Metab Dis.* 2007; 30 (4): 423-9.
7. American College of Medical Genetics Newborn Screening Expert Group. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system – executive summary. *Pediatrics.* 2006; 117 (5 Suppl 2): S296-307.
8. American College of Medical Genetics. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system. *Genet Med.* 2006; Suppl 1: 1S-252S.
9. Jensen UG, Brandt NJ, Christensen E, et al. Neonatal screening for galactosemia by quantitative analysis of hexose monophosphates using tandem mass spectrometry: a retrospective study. *Clin Chem.* 2001; 47 (8): 1364-72.
10. Wilcken B. Expanded newborn screening: reducing harm, assessing benefit. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33 Suppl 2: S205-10.
11. Niu DM, Chien YH, Chiang CC, et al. Nationwide survey of extended newborn screening by tandem mass spectrometry in Taiwan. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33 Suppl 2: S295-305.
12. Wilson JMG, Jungner G. *Principles of Screening for Disease.* Geneva: World Health Organization; 1968.
13. Burton H, Moorthie S. Expanded newborn screening: A review of the evidence. PHG Foundation; 2010. Dosegljivo na: <http://www.phgfoundation.org/print/reports/5504/>
14. Vittozzi L, Hoffmann GF, Cornel M, et al. Evaluation of population newborn screening practices for rare disorders in member states of the European Union. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* 2010; 5 Suppl 1: 26.
15. Hale JE, Parad RB, Dorkin HL et al. Cystic fibrosis newborn screening: using experiences to optimize the screening algorithm. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33 Suppl 2: S255-61.
16. Dhondt JL. Expanded newborn screening: social and ethical issues. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33 Suppl 2: S211-S7.
17. Kržišnik C, Battelino T, Bratanič N, et al. Results of screening for congenital hypothyroidism during the ten-year period (1981-1991) in Slovenia. *Zdrav Vestn.* 1994; 63 Suppl 1: 29-31.
18. Battelino T, Kržišnik C, Pavlin K. Early detection and follow up of children with phenylketonuria in Slovenia. *Zdrav Vestn.* 1994; 63 Suppl 1: 25-8.
19. Žerjav Tanšek M. Fenilketonurija – zgodba o uspešnem zdravljenju presnovne bolezni. *Slov Pediatr.* 2003; 10: 225-35.
20. Žerjav Tanšek M, Repič Lampret B, Stopar Obreza M, et al. Presejalni testi novorojenčkov v Sloveniji in zdravljenje ob diagnozi prirojene presnovne bolezni. In: Kržišnik C, Battelino T, eds. *Izbrana poglavja iz pediatrije* 21. Ljubljana: Medicinska fakulteta; 2009. p. 236-47.