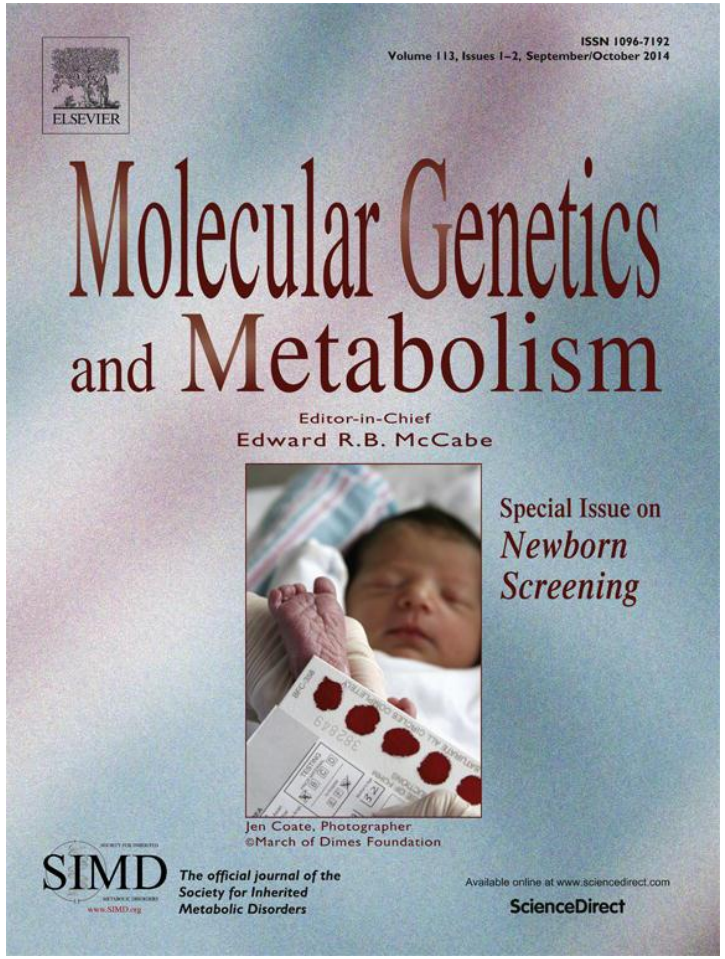
# Program presejalnega testiranja novorojencev za vrojene bolezni- širitev presejanja z LC-MS/MS

**Pediatrična klinika, UKCL**: Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko (SSLD) in Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove (KO EDPB)

**Klinika za nuklearno medicino, UKCL**: Oddelek za klinično radiokemijo

# Izhodišča za razširitev presejanja

- Nove tehnologije spreminjajo odločitve o uvrstitvi bolezni v program presejanja
- Raziskave kažejo, da do 20% otrok z MCADD umre, če jih ne prepoznamo ob rojstvu in ustrezno zdravimo (Wilcken 2010)
- S trenutnim naborom presejanja močno zaostajamo za razvitimi evropskimi državami

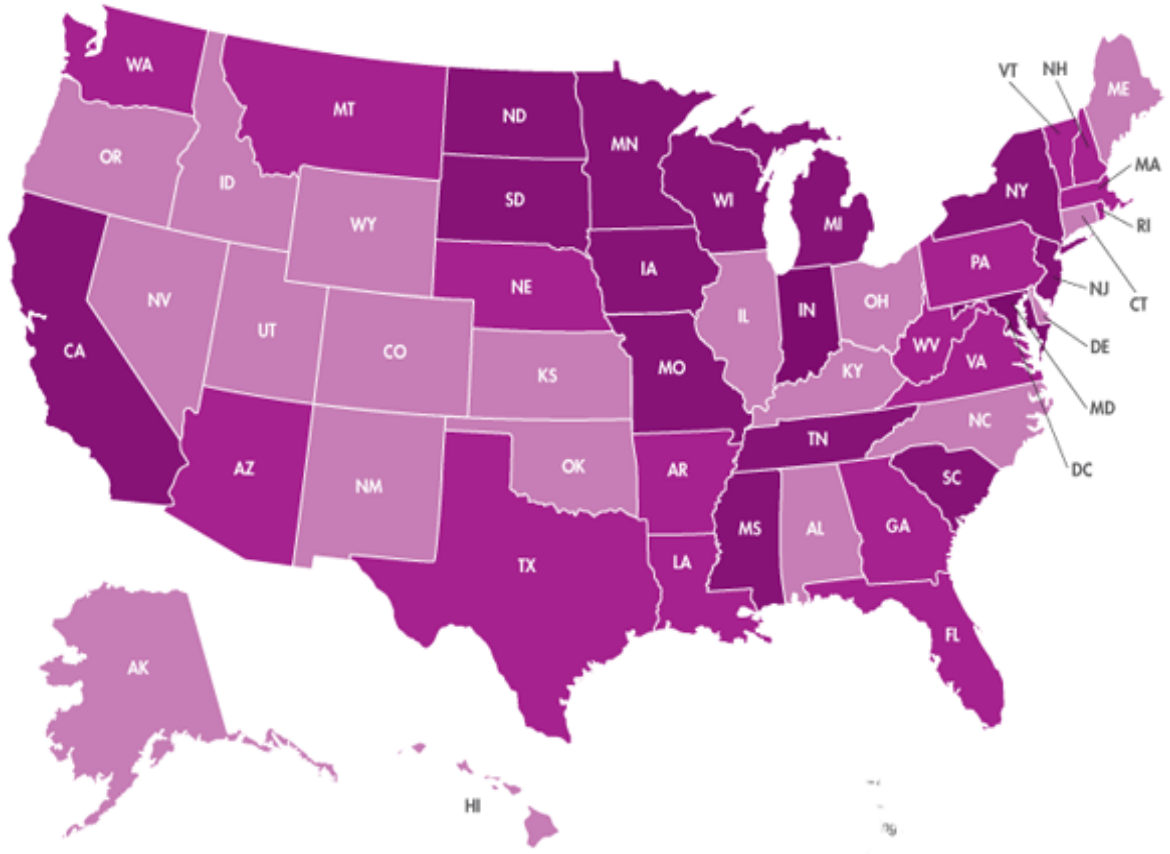


# Stanje presejanja po svetu: ZDA

> 50

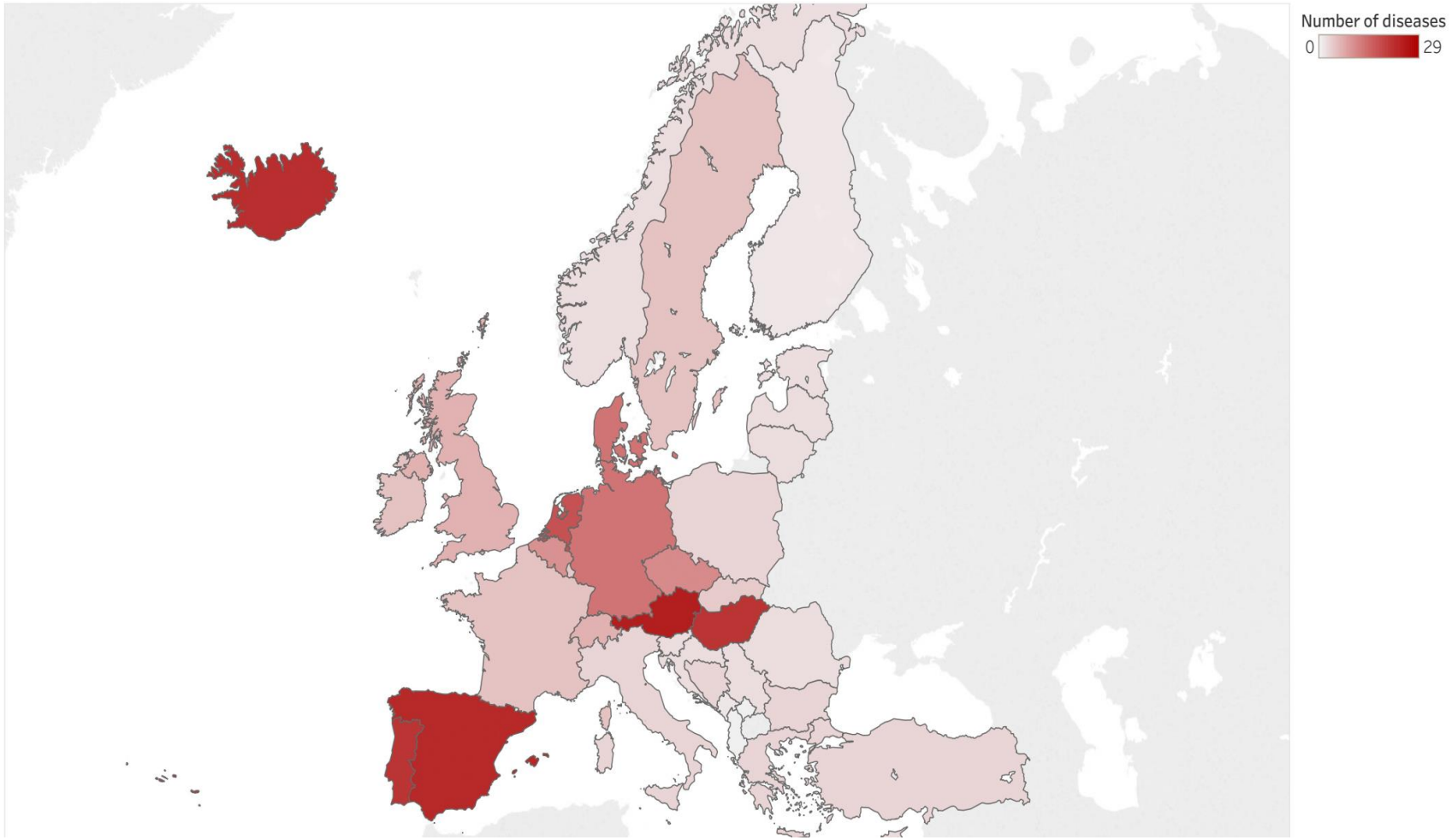
40 – 49

< 39



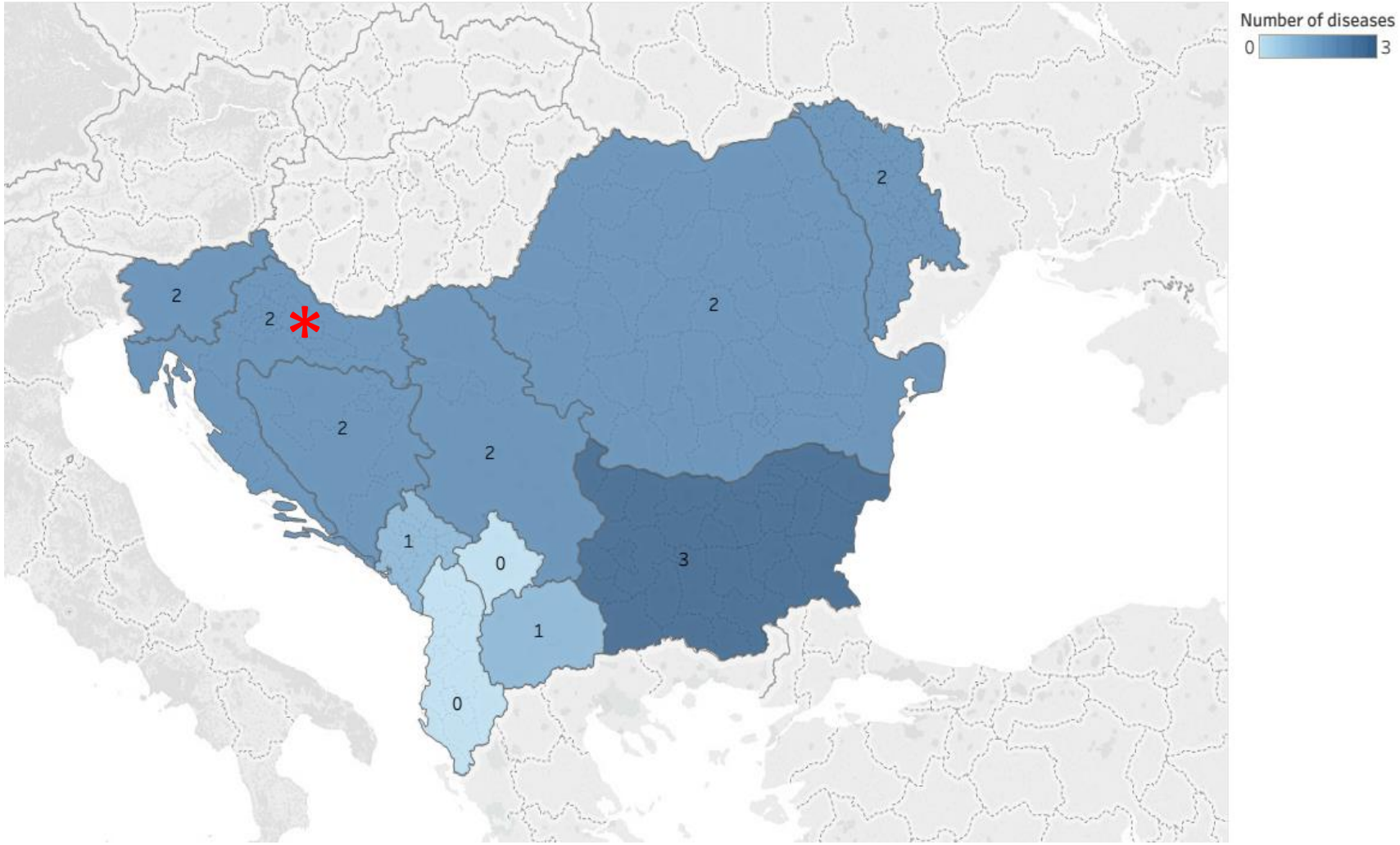

Save Babies Through Screening Foundation, 2011

# Presejanje v EU




Loeber JG, 2011

# Presejanje v JV Evropi



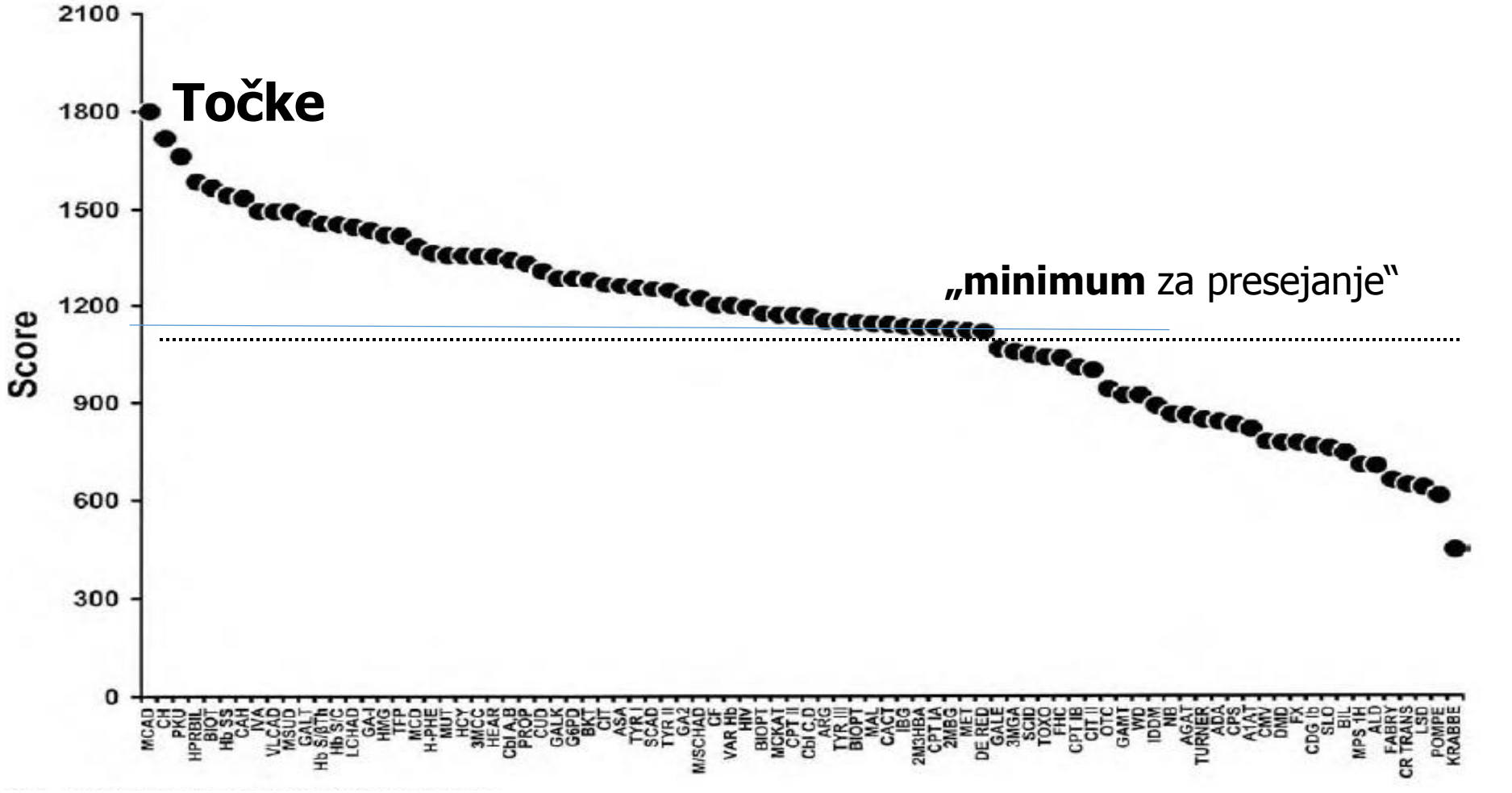

Groselj U, 2014

# Širitve presejalnih programov v JV Evropi

| | Št. centrov | Presejanje poteka za: | Širjenje programa (v letih) | Nove VBP |
|---|---|---|---|---|
| Albanija | 0 | 0 | 5 | CH, PKU |
| Bolgarija | 1 | CH, PKU, CAH | 2 | CF |
| Hrvaška | 1 | CH, PKU | 1 | CUD, GA I, IVA, LCHADD, MSUD, MCADD, VLCADD |
| Črna Gora | 1 | CH | Ne | / |
| Romunija | 5 | CH, PKU | 2 | Galaktozemija |
| Srbija | 2 | CH, PKU | Ne | / |
| Slovenija | 1 | CH, PKU | 3 | GA I, IVA, LCHADD, MSUD, MCADD, VLCADD |

Grošelj 2014

# Končno število točk za različne bolezni




**Bolezni**

Watson MS, et al. 2006;8 (5 Suppl):12S-252S.

# Države EU – katere bolezni presejajo?

| Bolezen | Število držav, ki imajo bolezen v presejalnem programu |
|---|---|
| Kongenitalna hipotiroza | Vse države EU |
| Fenilketonurija | Vse države EU |
| Kongenitalna adrenalna hiperplazija | 15 |
| Cistična fibroza | 10 |
| Pomanjkanje biotinidaze | 10 |
| Galaktozemija | 10 |
| Motnja oksidacije srednjeverižnih maščobnih kislin (MCADD) | 13 |
| Organske acidurije | 8 (več bolezni), 3 (le nekaj bolezni) |
| Aminoacidopatije | 6 (več bolezni), 3 (le nekaj bolezni) |

Loeber JG, 2011

# Presejalni testi novorojencev v obdobju 2005 – 2008 v Nemčiji in Sloveniji

| Značilnost | Nemčija | Slovenija |
|---|---|---|
| Število presejanih novorojencev | 2753 tisoč novorojencev | 79 tisoč novorojencev |
| Število bolezni v testih | 14 | 2 |
| Število odkritih bolnikov | 1932 | 51 |
| Skupna incidenca vseh bolezni v presejalnih testih | 1/1428 | 1/1545 |
| Incidenca kongenitalne hipotiroze | 1/3947 | 1/1926 |
| Incidenca fenilketonurije | 1/5584 | 1/7900 |
| Skupna incidenca ostalih bolezni | 1/3725 | ? (? 21 otrok ni prejelo diagnoze ob rojstvu) |

Harms 2011, Šmon 2015

# Študija na 10.000 neonatalnih vzorcih (kumulativna incidenca 1/1440)

| Bolezen (12 dodatnih prirojenih bolezni presnove poleg fenilketonurije) | Število bolnikov |
|---|---|
| Pomanjkanje srednje verižne acil-CoA dehidrogenaze (MCADD) | (2) * |
| Glutarična acidurija tip I | 1 |
| Glutarična acidurija tip II | |
| Bolezen urina javorjevega sirupa | |
| Izovalerična acidurija | |
| Propionska acidurija | |
| Metilmalonska acidurija | (1) * |
| Fenilketonurija | 2 |
| Pomanjkanje dolgo in zelo-dolgo verižne acil-CoA dehidrogenaze | 1 |
| Pomanjkanje karnitinske palmitoil transferase 1 in 2 | |
| Pomanjkanje privzema karnitina | |
| Pomanjkanje 3-metilkrotonil-CoA karboksilaze | 3 |

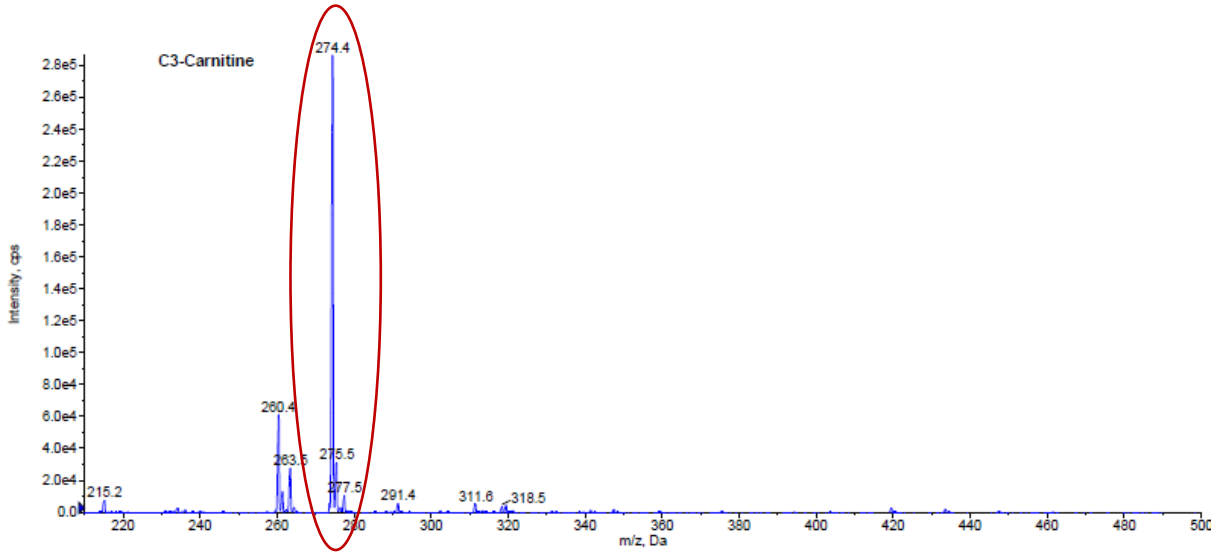
* Diagnoza postavljena po pojavu klinične slike

# Del Slovenskega registra bolnikov z redkimi boleznimi (2017)

| Motnje v presnovi aminokislin/proteinov | |
|---|---|
| Fenilketonurija | 164 |
| Pomanjkanje $BH_4$ (PTPS) | 2 |
| Propionska acidemija | 2 |
| Metilmalonska acidemija | 2 |
| Glutarična acidemija tip I | 4 |
| Motena presnova glutationa | 1 |
| Pomanjkanje glicerolne kinaze | 1 |
| Neketotična hiperglicinemija | 3 |
| Kanavanova bolezen | 1 |
| Motnja ciklusa sečnine | 7 |
| Homocistinurija | 7 |
| Pomanjkanje 3-metilkrotonil-CoA karboksilaze | 3 |
| 3-metilglutakonična acidurija tip 1 | 1 |
| Kanavanova bolezen | 1 |
| Bartov sindrom | 1 |
| Alkaptonurija | 1 |

| Motnje v presnovi maščobnih kislin | |
|---|---|
| Pomanjkanje srednjeverižne acil-coA dehidrogenaze (MCAD) | 2 |
| Multipli acil-Coa dehidrogenacijski defekt | 1 |
| Pomanjkanje dolgoverižne 3-hidroksi- acil-CoA dehidrogenaze (LCHADD) | 4 |
| Pomanjkanje dolgoverižne acil-coA dehidrogenaze (VLCAD) | 2 |
| Pomanjkanje kratkoverižne acil-coA dehidrogenaze (SCAD) | 1 |
| Motnje glikozilacije | |
| CDG tip II | 1 |
| Lizosomske bolezni | |
| Fabrijeva bolezen | 42 |
| Gaucherjeva bolezen | 20 |

# LC-MS/MS: organske acidurije




Povišan C3-karnitin

**Propionska acidemia**

**ali**

**Metilmalonska acidemija**

# Razširjen program presejalnega testiranja novorojencev

- kongenitalno hipotireozo
- fenilketonurijo (PKU)
- bolezen javorjevega sirupa (MSUD)
- izovalerično acidemijo (IVA)
- glutarično acidemijo tip I (GAI)
- glutarično acidemijo tip II (GAII)
- pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze (VLCAD)
- pomanjkanje dolgoverižne 3OH-CoA dehidrogenaze (LCHAD)
- pomanjkanje srednjeverižne acil-CoA dehidrogenaze (MCAD)
- propionsko acidemijo (PA)
- metilmalonsko acidemijo (MMA)
- pomanjkanje karnitin palmitoiltransferaze I (CPTI)
- pomanjkanje karnitin palmitoiltransferaze II (CPTII)
- motnjo vnosa/transporta karnitina (CUD)
- pomanjkanje holokarboksilazne sintaze (MCD)
- pomanjkanje β-ketotiolaze (βKT)
- pomanjkanje 3-metilkrotonil-CoA karboksilaze (3-MCC)
- tirozinemijo tip 1 (TYRI)

**V primeru, da se pri testiranju za vrojene bolezni iz prejšnjega odstavka zasledi tudi druga vrojena bolezen, ki jo je mogoče zdraviti, se tudi za to bolezen izpelje nadaljnja diagnostika.**

# Prenovljen pravilnik MZ

- objava pravilnika v Uradnem Listu

  https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2018-01-2439?sop=2018-01-2439

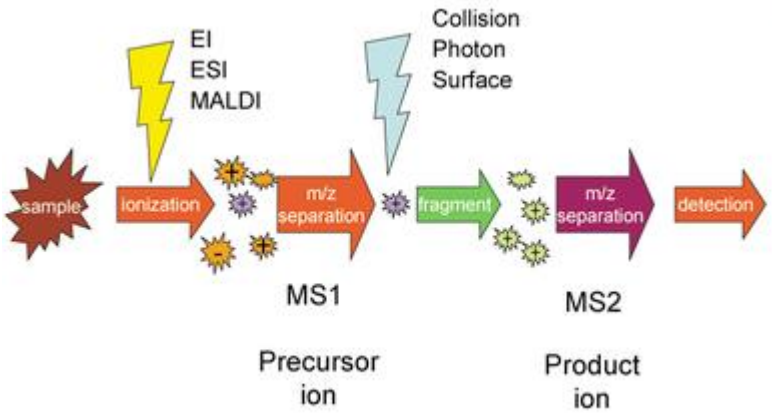
# Tandemska masna spektrometrija

Hitra, natančna, občutljiva

Kvantifikacija z izotopsko označenimi IS

Omogoča detekcijo širokega spektra presnovkov: organske acidurije, aminoacidemije, motnje v metabolizmu maščobnih kislin

Vzorci krvi, urina, krvni madež



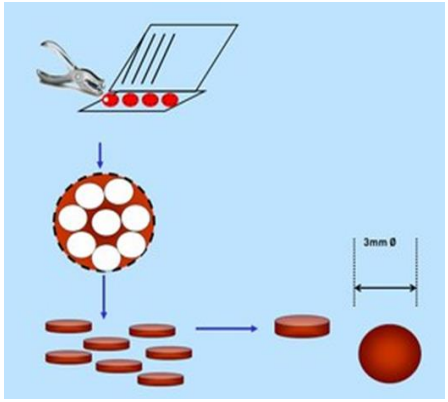
Priprava vzorca

3 mm krožec
iz posušene kaplje
krvi

Ekstrakcija, (derivatizacija),
rekonstitucija

Izotopski označeni
interni standardi

kontrole

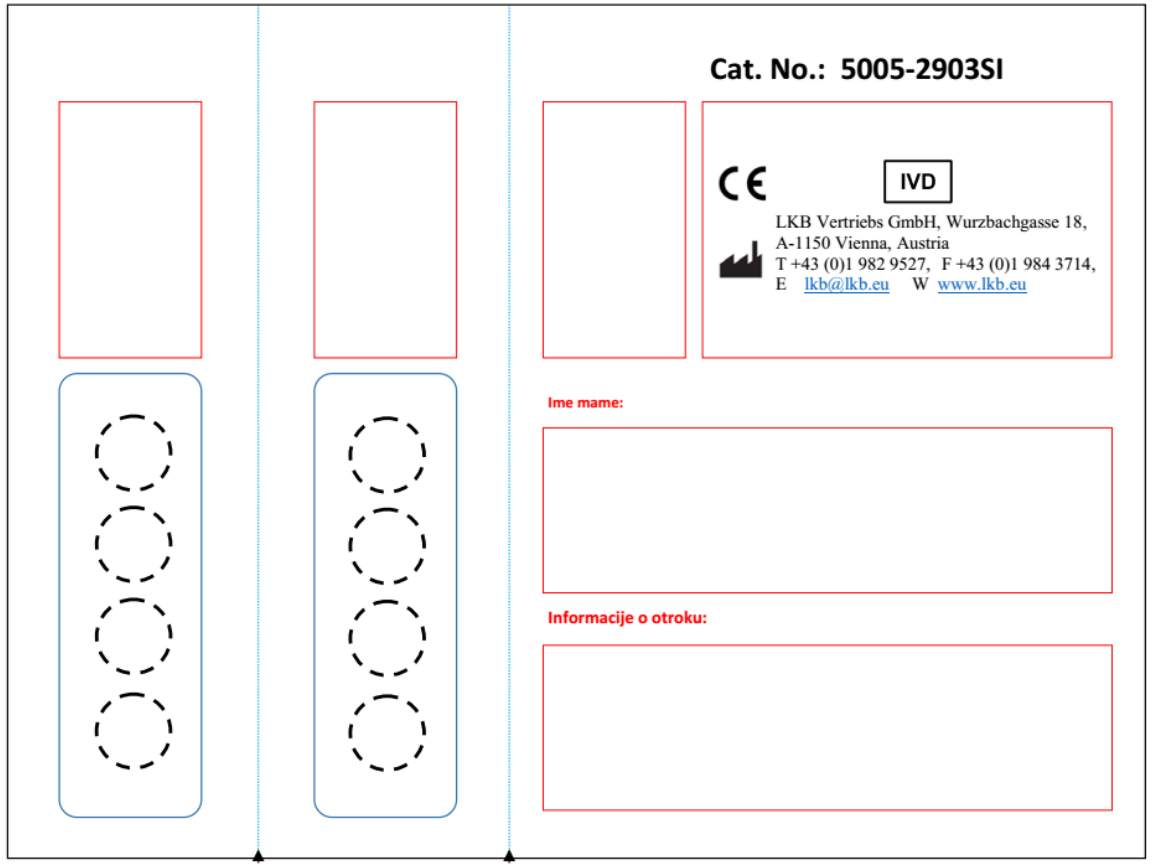



LC-MS/MS

57 analitov v < 2 min

Multirezidualna analiza
(MRM) za vsak analit

# Novo oblikovan filtrirni papir



# Pravilni odvzem vzorca- vpliv na izračun koncentracije analitov

- Predpisan filtrirni papir (vpojnost)
- Predpisan presek krožca
- Hematokrit

- Primer pravilnega odvzema

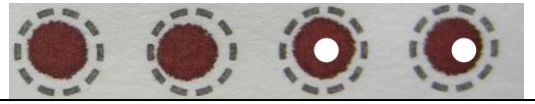
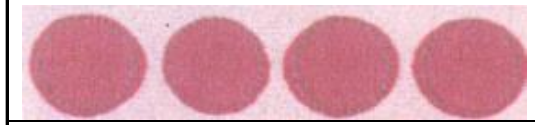
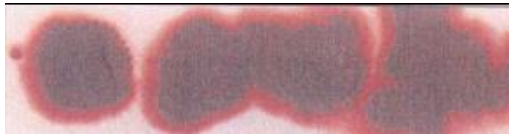
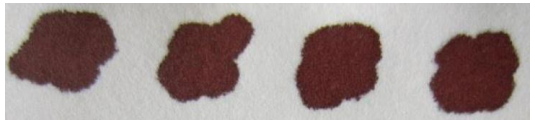
# Primeri nepravilnih odvzemov

Signifikantno nižji rezultati (15%-24%)

Večina analitov višji rezultati

Signifikantno nižji rezultati (14%-44%)

Heterogeni rezultati

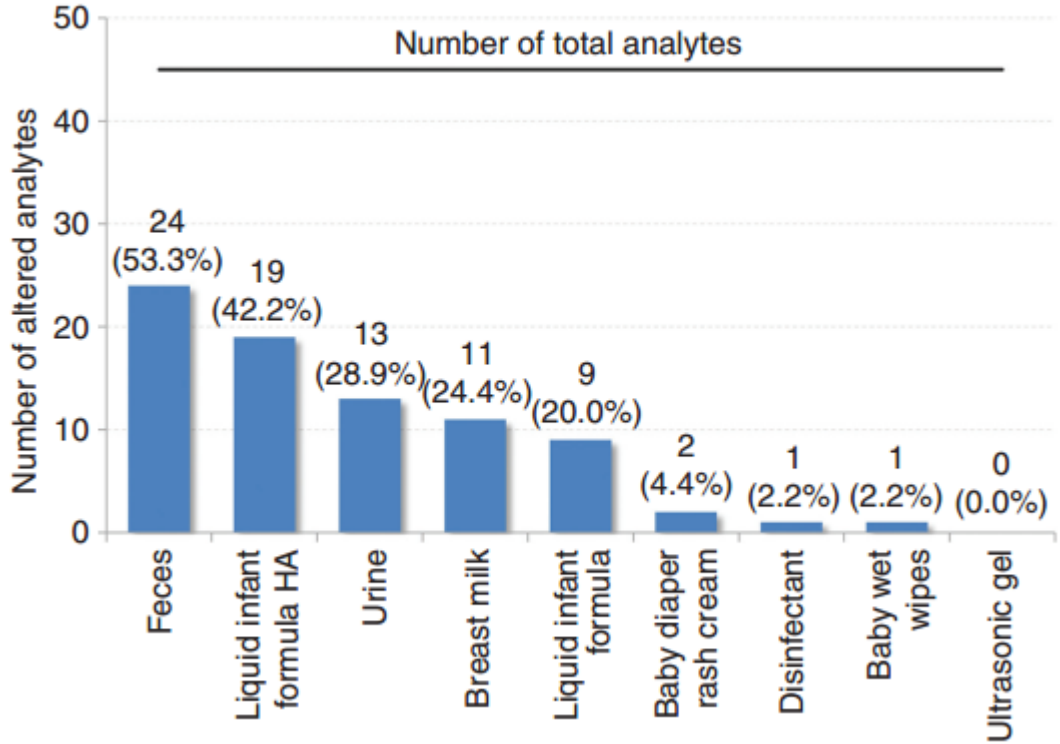
| | |
|---|---|
| Krvni madež manj kot 8 mm premera  | Premalo vzorca. |
| Nepopolna saturacija filtrirnega papirja | V primeru, da odstranimo kartico preden kri popolno napoji krožec na obeh straneh. Dotikanje filtrirnega papirja pred ali po vzorčenju z rokami z ali brez rokavic, losjonom za roke, itd. |
| Nanos več plasti krvi (iz obeh strani) | Nanos prevelike količina krvi na filtrirni papir. Nanašanje krvi tako na zgornjo kot tudi na spodnjo stran kartice. |
| Vzorci niso bili dobro posušeni  | Pošiljanje vzorcev, preden se vzorci posušijo (pred 3 urami). |
| Krvni madeži s serumskim obročem  | Alkohol ni obrisan s pete preden se naredi punkcija. Kontakt kartice z alkoholom, losjonom za roke, vodo, mlekom, itd. Prekomerno stiskanja petke okoli mesta odvzema. Nepravilno sušenje vzorca. |
| Stisnjen vzorec s premajhno količino krvi | Filtrirni papir je bil stisnjen, da je kri navidezno prepojila papir do oznake. |
| Vzorec z večimi kapljicami  | Na označeno mesto filtrirnega papirja je bilo nanešeno več majhnih kapljic, namesto ene velike, zato te vzorci niso pravilno prepojeni. |

DE GRUYTER

Clin Chem Lab Med 2017; aop

Theresa Winter*, Anja Lange, Anke Hannemann, Matthias Nauck and Cornelia Müller

# Contamination of dried blood spots – an underestimated risk in newborn screening



# Pošiljanje vzorcev

- Vzorce krvi dobro posušimo- vsaj 3 h na sobni temperaturi, na ravni podlagi
- Poslati na KNM v 24h od vzema vzorca- zaželeno do 9h dan po odvzemu
- KNM potrdi sprejem vzorca; opravi analize iz enega dela vzorca (4 madeži), enako kot že poteka
- Drugi del filtrirnega papirja posreduje v SSLD PK; opravi razširjeno presejanje

# Neustrezni vzorci

- Bodo zavrnjeni, obvestilo v bolnišničnem informacijskem sistemu in na elektronsko pošto za nujna obvestila

| | |
|---|---|
| **Pomanjkljivo označena kartica** | Manjka ena od potrebnih nalepk. |
| **Poškodovana kartica** | Strgana, zmečkana ali drugače poškodovana kartica. |
| **Kontaminirani vzorci** | Neustrezno rokovanje s filtrirnim papirjem. Filtrirnega papirja se ne smemo dotikati (niti z rokavicami), niti ga odlagati na umazane površine. |
| **Nepravilni odvzem** | |

# Odgovornost porodnišnic

- Imenovati odgovorne osebe, ki bodo 2x dnevno preverile obvestila in rezultate
- Zagotovi kontaktni elektronski naslov za nujna obvestila
- Vpis potrebnih podatkov v informacijski sistem
- Vodi dokumentacijo
  - o opravljenih odvzemih
  - o pošiljanju
  - o času in osebi, ki je sprejela izvide in obvestila o pozitivnih rezultatih
  - evidenco o ponovnih odvzemih

# Ukrepanje glede na rezultate

| Meritev | Ukrepanje |
|---|---|
| **Rezultati znotraj normalnega območja** | **Ni nadaljnjega ukrepanja. Porodnišnica bo o normalnem izvidu obveščena preko informacijskega sistema.** |
| **Mejni rezultati** | **Kontaktiramo porodnišnico (preko informacijskega sistema) in prosimo za kontrolni odvzem.** |
| **Ponovno mejni rezultati ali pozitivni rezultati** | **Kontaktiramo porodnišnico (preko informacijskega sistema in glede na stopnjo nujnosti telefonsko). Otroka se napoti na KOEDPB.** |
| **Pozitivni rezultati** | **Kontaktiramo porodnišnico (preko informacijskega sistema in glede na stopnjo nujnosti telefonsko). Otroka se napoti na KOEDPB.** |

# Ukrepanje glede na rezultate

- **Rezultat NUJNO**: potrebna je napotitev otroka na ponovni odvzem ali na KOEDPB prvi naslednji delovni dan

- **Rezultat ZELO NUJNO**: porodnišnica je dodatno telefonsko obveščena o rezultatu, otrok pa je še isti delovni dan napoten na KOEDPB

- V primeru, ko analize ne bo mogoče opraviti v SSLD, se bo vzorce v najkrajšem mogočem času poslalo v drug laboratorij, ki opravlja enake analize.

# Informiranje staršev

- Presejanje novorojencev – iz vidika otroka/družine pomeni minimalno breme in potencialno velikansko korist; pisna privolitev v poseg ni potrebna, ker se predpostavlja

- Potrebno pa je informiranje staršev - pediater neonatolog ob prvem pregledu po rojstvu na kratko predstavi pomen in potek izvajanja programa

- V kolikor bi starši kljub dodatnem informiranju in premisleku odklanjali odvzem za presejanje, morajo to potrditi s podpisano izjavo na kartici in se ta brez odvzema vzorca (z izpolnjenimi podatki matere in otroka) pošlje v laboratorij; otrok je napoten v ambulanto na PK, obveščen je izbrani pediater

Služba za specialno laboratorijsko diagnostiko (SSLD): Mirjana Zupančič, Barbka Repič Lampret, Andraž Šmon, Žiga Remec, Vanja Čuk

Klinični oddelek za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove (KO EDPB): Tadej Battelino, Mojca Žerjav Tanšek, Urh Grošelj, Ana Drole Torkar

Oddelek za klinično radiokemijo: Katja Zaletel, Adrijana Oblak, Ajda Biček