

Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch metodou tandemové hmotnostní spektrometrie

Chrastina P., Štastná S., Myšková H., Košařová M., Elleder M., Zeman J.

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

SOUHRN

Cíl studie: Zhodnotit připravenost pracoviště pro celostátní screening 19 dědičných metabolických poruch (DMP) metodou tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS).

Materiál a metoda: Vyšetřeno bylo 40 393 vzorků z novorozeneckého screeningu a 13 315 vzorků od dětí s klinickým podezřením na DMP. Kontrolní skupinu tvořilo 1130 vzorků od 118 pacientů s již potvrzenou DMP.

Výsledky: Senzitivita metody na kontrolním souboru byla 97,5%. V novorozeneckém screeningu jsme diagnostikovali 7 pacientů s DMP: 4 s fenylketonurií/hyperfenylalaninemií (PKU/HPA), 2 s poruchou β -oxidace mastných kyselin (BOX MK) a 1 s metylmalonovou acidémií (MMA). Incidence DMP v novorozenecké populaci v naší spádové oblasti byla 1 : 5 771. V prospektivním selektivním screeningu jsme diagnostikovali DMP u 14 pacientů: 9 s poruchou BOX MK, 3 s PKU/HPA, 1 s tyrosinemií I. typu a 1 s MMA.

Závěr: Včasná diagnostika léčitelných DPM před rozvojem příznaků onemocnění spolu s genetickým poradenstvím a prenatální diagnostikou představují nejefektivnější lékařský přístup k DPM. Nyní jsme schopni diagnostikovat 19 DMP při novorozeneckém screeningu pomocí MS/MS.

Klíčová slova: dědičné metabolické poruchy, novorozenecký screening, tandemová hmotnostní spektrometrie.

SUMMARY

Chrastina P., Štastná S., Myšková H., Košařová M., Elleder M., Zeman J. Newborn Screening of Inherited Metabolic Disorders by Tandem Mass Spectrometry

Objective: To confirm preparedness of our department for newborn screening of 19 inherited metabolic disorders (IMDs) by tandem mass spectrometry (MS/MS).

Material and Method: We analysed 40 393 samples from newborn screening and 13 315 samples from patients suspected for IMDs. Control group was 1130 samples from 118 patients with confirmed IMDs.

Results: Sensitivity of the method in control group was 97.5%. In newborn screening, we detected 7 patients with IMDs: 4 with phenylketonuria/hyperphenylalaninemia (PKU/HPA), two with disorders of fatty acids β -oxidation and one with methylmalonic acidemia (MMA). The overall incidence of IMDs in newborn population was 1 : 5771. In the prospective selective screening, we diagnosed IMDs in 14 patients: 9 with disorders of fatty acids β -oxidation, three with PKU/HPA, one with tyrosinemia type I and one with MMA.

Conclusion: Early diagnostics of treatable IMDs before clinical symptoms together with genetic counselling and prenatal diagnostics represent the most effective medical approach to IMDs. We are now able to diagnose 19 IMDs in newborn screening by MS/MS.

Key words: inborn errors of metabolism, newborn screening, tandem mass spectrometry.

Dědičné poruchy metabolismu (DPM) tvoří heterogenní skupinu více než 500 různých onemocnění, která se významně podílejí na nemocnosti a úmrtnosti dětí i dospělých (1). Ačkoliv jen menší část DPM je v současné době léčitelná, představuje novorozenecký screening dietou léčitelných DPM, mezi které patří především poruchy metabolismu aminokyselin, organické acidurie a poruchy β -oxidace mastných kyselin, spolu s genetickým poradenstvím a prenatální diagnostikou nejdokonalejší a nejefektivnější lékařský přístup k DMP, a to především v situaci, jsou-li prováděny celostátně (6). Novorozenecký screening dědičných metabolických poruch (DMP) oslavil v loňském roce čtyřicet let své existence. Započal v roce 1962 zavedením Guthrieho bakteriálního testu pro včasné rozpoznání PKU/HPA v USA.

Po úspěchu s rozpoznanou PKU/HPA byly vyvinuty další specifické screeningové testy pro různé choroby včetně metabolických (galaktosémie, leucinóza, homocystinurie atd.), dále endokrinopatií (kongenitální hypotyreóza, kongenitální adrenální hyperplazie), infek-

čních chorob (kongenitální syfilis, kongenitální toxoplazmóza), hemoglobinopatií a cystické fibrózy.

Moderní přístup k novorozeneckému screeningu DPM závisí na ekonomické úrovni a organizaci zdravotní péče jednotlivých regionů.

V ČR byla ve větším rozsahu Guthrieho metoda pro screening PKU využívána od roku 1969, celoplošný národní novorozenecký screening PKU byl zahájen v roce 1975. Později byl novorozenecký screening v České republice rozšířen o vyšetřování kongenitální hypotyreózy a v současné době se připravuje screening kongenitální adrenální hyperplazie.

Od 90. let 20. století se v novorozeneckém screeningu DPM začala uplatňovat nová analytická technika – tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Tato metoda podle potřeby umožňuje v jedné suché kapce krve při relativně nízkých finančních nákladech na vyšetření jedné DMP rozpoznat až několik desítek závažných DPM (tab. 1) ještě před rozvojem klinických příznaků onemocnění. Předkládáme výsledky vlastní pilotní studie screeningu DPM pomocí MS/MS.

Table 1. Disorders that can be screened for by tandem mass spectrometry (2,4)

<p>Amino acid disorders</p> <p>maple syrup urine disease phenylketonuria tyrosinemia type 1 homocystinuria hyperornithinemia</p> <p>Organic acid disorders</p> <p>glutaric acidemia, type 1 glutaric acidemia, type 2 3-hydroxy-3-methylglutaryl -CoA lyase deficiency isovaleric acidemia 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency methylmalonic acidemia propionic acidemia 3-ketothiolase deficiency</p> <p>Disorders of cholesterol and bile acids metabolism</p> <p>Disorders of purine and pyrimidine metabolism</p>	<p>Fatty acid oxidation defects</p> <p>carnitine palmitoyltransferase 1 carnitine palmitoyltransferase 2 carnitine/acylcarnitine translocase defect long-chain L-3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase / trifunctional protein deficiency medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency carnitine transporter defect</p> <p>Urea cycle disorders</p> <p>citrullinemia arginase deficiency argininosuccinic aciduria HHH syndrome</p> <p>Peroxisomal disorders</p> <p>Lysozomal disorders</p>
---	---

Materiál a metoda

V období let 2000–2004 jsme metodou MS/MS vyšetřili celkem 40 393 vzorků krve získaných v rámci novorozeneckého screeningu PKU z naší spádové oblasti a 13 315 vzorků krve od dětí a dospělých pacientů s klinickým podezřením na DPM ze všech regionů ČR. V retrospektivní studii jsme vyšetřili 1130 vzorků krve od 118 pacientů s DMP. Diagnóza u nich byla potvrzena vyšetřením aktivity deficitního enzymu a/nebo molekulárně genetickým vyšetřením. Vzorky byly vyšetřovány ve skupinách pod číselným kódem a po vyhodnocení dodatečně identifikovány.

Koncentrace acylkarnitinů a aminokyselin byly stanoveny metodou tandemové hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrospřejem a přímým nástřikem vzorku. Aminokyseliny a acylkarnitiny byly extrahovány 200 µl metanolu obsahujícího deuteriem značené standardy aminokyselin a acylkarnitinů z terčiku ze suché krevní kapky o poloměru 3 mm po dobu 25 minut. Odparek byl butylován při 60 °C 30 minut. Před analýzou byl odparek rozpuštěn ve směsi acetonitrilu a vody (50/50 v/v) s přísadkem 0,02% kyseliny mravenčí. Aminokyseliny byly stanoveny skenem konstantní neutrální ztráty 102 a acylkarnitiny skenem rodičovských iontů pro dceřiný ion 85. Kvantifikace se prováděla z poměrů intenzit molekulárních iontů aminokyselin, acylkarnitinů a příslušných standardů.

Výsledky

Hodnoty cut-off pro jednotlivé aminokyseliny a acylkarnitiny jsme nastavili na základě literárně publikovaných dat (3, 7, 8) a ověřili na našem souboru pacientů. Stanovili jsme pravidla pro diagnostiku 19 DMP (tab. 2). Mez detekce v suché kapce krve pro acylkarnitiny metodou MS/MS je 0,05 µmol/l a pro aminokyseliny 5 µmol/l.

Table 2. Disorders screened by tandem mass spectrometry

Class	Disorder	Estimated incidence
Amino acids	maple syrup urine disease	1:185 000
	phenylketonuria	1:14 000
	tyrosinemia type 1	1:100 000–200 000
Organic acids	glutaric acidemia, type 1	1:50 000
	glutaric acidemia, type 2	not established
	3-hydroxy-3-methylglutaryl -CoA lyase deficiency	> 100 cases
	isovaleric acidemia	> 70 cases
	3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency	> 50 cases
	methylmalonic acidemia	1:48,000–61,000
	propionic acidemia	1:87,000–137,000
	3-ketothiolase deficiency	> 50 cases
	Fatty acids	carnitine palmitoyltransferase 1
carnitine palmitoyltransferase 2		> 200 cases
carnitine/acylcarnitine translocase defect		~ 10 cases
long-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/trifunctional protein deficiency		> 200 cases
medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency		1:14,000
short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency		not established
very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency		> 200 cases
carnitine transporter defect		not established

U kontrolní skupiny pacientů s DMP nález svědčil pro sledovanou diagnózu, pouze u tří pacientů s deficitem dehydrogenázy krátkých acyl-CoA, karnitinpalmitoyltransferázy II a dehydrogenázy dlouhých 3-hydroxyacyl-CoA při dobré metabolické kompenzaci byl nález normální. Senzitivita metody na tomto souboru byla 97,5%. V rámci novorozeneckého screeningu jsme zachytili 7 no-

vorozenců s DMP (tab. 3, 4). Incidence sledovaných DMP v novorozenecké populaci v naší spádové oblasti je 1 : 5771. V rámci selektivního screeningu byla diagnóza DMP určena u 14 pacientů (tab. 3, 5).

Table 3. Results of newborn and selective screening of inherited metabolic disorders

Screening	Total patients	Patients with IMD	False-positive tests	Mean positive predictive value
Newborn	40393	7	118 (0.29 %)	5.6%
Selective	13315	14	7 (0.06 %)	66.7%

Table 4. Patients detected from newborn screening of inherited metabolic disorders

Disorder	Number of patients
phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	4
long-chain 3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase deficiency	1
medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	1
methylmalonic acidemia	1

Table 5. Patients detected from selective screening of inherited metabolic disorders

Disorder	Number of patients
medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	5
phenylketonuria/hyperphenylalaninemia	3
multiple acyl-CoA dehydrogenase deficiency	2
very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency	1
tyrosinemia type I	1
methylmalonic acidemia	1
deficiency of transport of acylcarnitines	1

Diskuse

Dědičné poruchy metabolismu aminokyselin, organické acidurie a poruchy β -oxidace mastných kyselin (tab. 1), které lze diagnostikovat v rámci novorozeneckého screeningu DPM metodou MS/MS, se klinicky obvykle projevují závažnou akutní dekompenzací, často již v útlém věku. Prognóza včas nediodagnostikovaných a neléčených dětí je většinou nepříznivá, u dětí, které přežijí akutní ataku onemocnění, často dochází k poškození CNS a poruše psychomotorického vývoje (1).

Metoda MS/MS je velice citlivá a specifická a umožňuje stanovit koncentrace aminokyselin a acylkarnitinů již v několika mikrolitrech krve. Přístroje pro MS/MS jsou vysokokapacitní a umožňují vyšetřit v průběhu jednoho pracovního dne několik set vzorků. Počet falešně pozitivních nálezů se oproti stávajícím metodám redukuje z 1,5 % na 0,29 % a pro PKU/HPA je to dokonce 0,03 % (4). Tím se významně snižuje psychická zátěž rodin s falešně pozitivním výsledkem screeningu. Největším přínosem MS/MS je vysoký záchyt poruch β -oxidace mastných kyselin, které nejsou diagnostikovatelné jinými screeningovými metodami.

V současné době probíhají po celém světě pilotní studie (2) a 30 z 51 států USA již MS/MS používá jako

rutinní součást novorozeneckého screeningu (tab. 6). Studie prokázaly, že MS/MS včas zachytí onemocnění a umožní léčbu (5). Byla též zjištěna incidence různých DMP a v některých případech, např. u deficitu MCAD a deficitu 3-methylkrononyl-CoA-karboxylázy, se ukázalo, že skutečná incidence těchto DMP je až několikrát větší, než se doposud předpokládalo (4, 5).

Table 6. Results of ongoing screening programs using tandem mass spectrometry (2)

Program	Duration	Number screened	Incidence
New South Wales, Australia	1 year	137 000	1 : 4420
New England, USA	2 years	164 000	1 : 4830
Neo Gen Screening, USA	7 years	700 000	1 : 4300
Bavaria, Germany	7 months	87 000	1 : 3960

Výhoda nového screeningu DPM metodou MS/MS nespočívá pouze v rozšíření screeningu PKU o další DPM, ale také v tom, že vzorek krve lze odebrat již 3. den po narození (5). To umožňuje časnější propouštění fyziologických novorozenců a jejich matek z porodnic.

Závěr

Tandemová hmotnostní spektrometrie je výkonná a vysoce senzitivní technologie, která umožňuje při novorozeneckém screeningu diagnostikovat až několik desítek různých DMP. Včasná diagnostika léčitelných DPM ještě před rozvojem příznaků onemocnění spolu s genetickým poradenstvím a prenatalní diagnostikou představují nejefektivnější lékařský přístup k DPM. Výsledky naší pilotní studie ukazují, že jsme schopni při novorozeneckém screeningu DPM pomocí MS/MS diagnostikovat 19 DMP, jejichž souhrnná incidence v naší spádové oblasti je 1 : 5771.

Literatura

1. **Beaudet, A. L.; Sly, W. S., Valle, D.** *Genetics, biochemistry, and molecular basis of variant human phenotypes*. In Scriver, C. R., Sly, W. S., Valle, D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York : McGraw-Hill 2001, p. 2–128.
2. **Jones, P. M., Bennet, M. J.** The changing face of newborn screening: diagnosis of inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 2002, 324, p. 121–128.
3. **Naylor, E. W., Chace, D. H.** Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid and amino acid metabolism. *J. Child. Neurol.*, 1999, 14, Suppl. 1, p. 4–8.
4. **Pollitt, R. J., Green, A., McCabe, C. J. et al.** Neonatal screening for inborn errors of metabolism: cost, yield and outcome. *Health Technol. Assessment*, 1997, 1.
5. **Rashed, M. S.** Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, 2001, 758, p. 27–48.

6. **Schoen, E. J., Baker, J. C., Colby, C. J., To, T. T.** Cost-benefit analysis of universal tandem mass spectrometry for newborn screening. *Pediatrics*, 2002, 110, p. 781–786.
7. **Schulze, A., Lindner, M., Kohlmüller, D. et al.** Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism by Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry: Results, Outcome, and Implications. *Pediatrics*, 2003, 111, p. 1399–1406.
8. **Zytkovicz, T. H., Fitzgerald, E. F., Marsden, D. et al.** Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin. Chem.*, 2001, 47, 11, p. 1945–1955.

Práce byla podpořena výzkumným záměrem Ministerstva zdravotnictví ČR VZ 64 165.

Redakci předáno 24. 2. 2005.

Adresa pro korespondenci:

Ing. Petr Chrástina

Ústav dědičných metabolických poruch VFN

a 1. LF UK Praha, Ke Karlovu 2

128 08 Praha 2

e-mail: petr.chrastina@lf1.cuni.cz

www: <http://www.vfn.cz/udmp>