Implementacija razširjenega presejanja novorojencev za vrojene bolezni presnove v Sloveniji

Implementation of extended newborn screening for inborn errors of metabolism in Slovenia

Barbka Repič Lampret
Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko

Avtor za korespondenco:
doc. dr. Barbka Repič Lampret, spec. med. biokem.
Pediatrična klinika, Klinični inštitut za specialno laboratorijsko diagnostiko, Vrazov trg 1, 1000 Ljubljana,
e-pošta: barbka.repic@kclj.si

POVZETEK

Razširjeno presejanje novorojencev na vrojene bolezni presnove (VBP) je bilo v Sloveniji uradno uvedeno septembra 2018. Obstoječemu programu presejanja za kongenitalno hipotirozo in fenilketonurijo smo dodali 17 VBP. Vse dodane bolezni testiramo z uporabo tandemske masne spektrometrije, ki omogoča sočasno merjenje številnih acilkarnitinov in aminokislin iz posušenega madeža krvi in možnost prepoznave različnih aminoacidopatij, organskih acidurij in motenj v presnovi maščobnih kislin. Za potrditveno testiranje smo dodatno implementirali metodo sekvenciranja DNA naslednje generacije. Za namen razširjenega presejanja za VBP so bile potrebne tudi določene organizacijske spremembe in povezava bolnišničnih informacijskih sistemov slovenskih porodnišnic z laboratorijskim informacijskim sistemom Pediatrične klinike in Klinike za nuklearno medicino. Od začetka razširjenega presejanja novorojencev za VBP do konca leta 2020 smo analizirali 39.324 vzorcev. Pri 12 bolnikih smo z dodatnimi potrditvenimi testi VBP potrdili še pred pojavom kliničnih znakov. Med njimi izstopa nepričakovano visok delež bolnikov z motnjami v presnovi dolgoverižnih maščobnih kislin, kar je lahko značilnost slovenskega prostora ali pa razmeroma majhnega števila analiziranih vzorcev.

Ključne besede: presejanje novorojencev, tandemska masna spektrometrija, sekvenciranje DNA nove generacije, vrojene bolezni presnove

ABSTRACT

In Slovenia, the expanded newborn screening for inborn errors of metabolism was introduced in September 2018. Seventeen metabolic diseases have been added to the pre-existing screening panel for congenital hypothyroidism and phenylketonuria. Therefore, tandem mass spectrometry was introduced since it enables simultaneous testing of numerous acylcarnitines and amino acids from dried blood spots for detecting several aminoacidopathies, organic

acidurias, and fatty acid oxidation disorders. Furthermore, next-generation sequencing was introduced for confirmatory testing. To introduce the expanded newborn screening, we needed to implement certain modifications to the existing organisation. Among them, existing heterogeneous information systems in the Maternity hospitals were connected to the laboratory information system of the University Children's Hospital and of the Department of Nuclear Medicine. Until the end of 2020, a total of 39,324 samples were screened. After additional testing, twelve patients were confirmed as positive. Among them, unusually high incidence of patients with very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency was observed.

Key words: newborn screening, tandem mass spectrometry, next-generation sequencing, inborn errors of metabolism

UVOD

Vrojene bolezni presnove (VBP) so redke genetsko pogojene motnje, pri katerih vzročne spremembe v genih lahko povzročijo deaktivacijo ali zmanjšano delovanje encimov, ki so pomembni pri različnih procesih presnove (1). Njihova pojavnost je običajno nižja od 1 na 10.000 živorojenih otrok (2). VBP lahko odkrijemo s presejalnimi metodami, katerih cilj je prepoznavanje bolezni pred pojavom prvih simptomov ali prvih stadijev bolezni. Razširjeno presejanje novorojencev za VBP je omogočila uporaba tandemske masne spektrometrije (MS/MS), ki omogoča istočasno kvantifikacijo številnih presnovkov iz samo ene kaplje krvi (3, 4). Pri seznamu bolezni, ki smo jih vključili v program razširjenega presejanja za VBP, smo upoštevali priporočila, da mora za bolezni v presejalnem programu obstajati test z ustrezno občutljivostjo in specifičnostjo, ki omogoča odkritje bolezni pred pojavom kliničnih znakov. Zgodnje odkritje mora zagotavljati pravočasno ukrepanje in s tem učinkovito zdravljenje, ki prepreči ali upočasni razvoj bolezni. Program mora biti tudi stroškovno učinkovit (5, 6). Pomembno merilo za vključitev bolezni v razširjeni program presejanja za VBP je bila tudi pojavnost posamezne bolezni, kar smo za področje Slovenije ocenjevali s posebno pilotno raziskavo (7). Za potrditveno testiranje smo implementirali tudi metodo sekvenciranja DNA naslednje generacije (NGS), ki nam poleg potrditve omogoča tudi spremljanje poteka bolezni ter možnost genetskega svetovanja drugim ožjim družinskim članom (8). Za izvajanje razširjenega presejanja novorojencev za VBP v Sloveniji sicer obstaja pravna podlaga (9). V Pravilniku za izvajanje zdravstvenega varstva na primarni ravni je navedenih vseh 18 bolezni, na katere testiramo novorojence. Opredeljeno je, kdaj naj bodo vzorci odvzeti, kako označeni in kje naj bo opravljena analiza. Zapisana je tudi odločba o izdaji enotnega izvida, ki mora biti posredovan porodnišnici, ki je vzorec poslala.

V članku je opisan program razširjenega presejanja novorojencev v Sloveniji ter njegova implementacija. Predstavljeni so tudi rezultati razširjenega testiranja za prvi dve leti.

IMPLEMENTACIJA PROGRAMA RAZŠIRJENEGA PRESEJANJA NOVOROJENCEV ZA VBP

Obstoječe stanje in priprave na širitev presejanja

Pred širitvijo programa presejanja novorojencev za VBP je v Sloveniji potekalo presejanje za fenilketonurijo in kongenitalno hipotirozo, ki ga od leta 1979 oziroma 1981 izvajajo na Kliniki za nuklearno medicino (KNM) (10). Leta 1999 smo za diagnostiko simptomatskih bolnikov na Pediatrični kliniki (PK) uvedli selektivno presejalno testiranje na VBP. Sledile so daljše priprave, raziskave in analize, ki so omogočile testiranje vseh novorojencev. Leta 2015 smo na Zdravstveni svet Ministrstva za zdravje podali vlogo za nov program presejanja novorojencev in konec maja 2018 prevzeli novo opremo za razširjeno pre- »

sejanje novorojencev za VBP LC-MS/MS »Waters Xevo TQD« in »Waters Xevo TQ-S micro« za potrditveno diagnostiko. Sledilo je povezovanje analizatorjev z laboratorijskim informacijskim sistemom (LIS), testiranje sistema in programske opreme, ki je potrebna za presejanje novorojencev v kombinaciji s Perkin Elmer reagenčnim kompletom Neobase 2. Po optimizaciji sistema smo opravili verifikacijo reagenčnega kompleta ter s pomočjo meritev na 1000 vzorcih postavili izključitvena merila – meje. Postavljene meje smo, zaradi prevelikega števila lažno pozitivnih rezultatov, kasneje popravili. Določene meje smo spremenili tudi na osnovi rezultatov zunanje ocene kakovosti (CDC – Newborn Screening acylcarnitines and amino acids). Prvih 1000 vzorcev novorojencev smo analizirali vzporedno na dveh sistemih, in sicer na novem z novim reagenčnim kompletom ter starem, na katerem smo imeli preverjene izključitvene meje.

Pričetek programa in vključevanje porodnišnic

Program razširjenega presejanja novorojencev za VBP je bil v Sloveniji uveden septembra 2018, ko je bila vključena prva porodnišnica. Preostale slovenske porodnišnice so se vključevale postopoma do avgusta 2019. Obstoječemu programu presejanja za kongenitalno hipotirozo in fenilketonurijo smo tako dodali 17 novih VBP:

- bolezen javorjevega sirupa,
- tirozinemija tip 1,
- izovalerična acidemija,
- glutarična acidemija tip I,
- glutarična acidemija tip II,
- pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze,
- pomanjkanje dolgoverižne 3OH-CoA dehidrogenaze,
- pomanjkanje srednjeverižne acil-CoA dehidrogenaze,
- propionska acidemija,
- metilmalonska acidemija,
- pomanjkanje karnitine palmitoiltransferaze I,
- pomanjkanje karnitine palmitoiltransferaze II,
- motnja vnosa/transporta karnitina,
- pomanjkanje 3-metilkrotonil-CoA karboksilaze,
- 3-hidroksi-3-metilglutarična acidurija,
- pomanjkanje holokarboksilaze sintaze,
- pomanjkanje β-ketotiolaze.

Organizacijske spremembe

Ob širitvi so bile vpeljane določene organizacijske spremembe. Prva je bila povezava podatkov novorojencev iz bolnišničnega informacijskega sistema slovenskih porodnišnic z laboratorijskim informacijskim sistemom PK in KNM. V porodnišnici, kjer je vzorec krvi odvzet, izvedejo tudi elektronsko naročilo v bolnišnični informacijski sistem ter natisnejo črtno kodo, s katero opremijo kartico. Porodnišnice so bile v ta namen opremljene z ustreznimi čitalci in tiskalniki črtnih kod. S tem smo zagotovili boljšo oziroma ustrezno sledljivost vzorca in rezultatov. Pri vzpostavitvi povezav bolnišničnih in laboratorijskih informacijskih sistemov so sodelovale vse slovenske programske hiše, odgovorne za bolnišnične informacijske sisteme (Infonet, Hipokrat, Birpis, Pina) ter Kobis, kot odgovorni za LIS. Ob priključevanju posamezne porodnišnice v sistem naročanja sta bila vedno prisotna tudi skrbnik LIS-a in sodelavec laboratorija Pediatrične klinike. Hkrati z implementacijo elektronskega naročanja smo izvedli tudi ponovno izobraževanje osebja porodnišnic o pravilnem odvzemu vzorca kaplje krvi na kartico ter pomembnosti dnevnega pošiljanja kartic z odvzetimi vzorci.

Skupaj s sodelavci KNM in Kliničnega oddelka za endokrinologijo, diabetes in bolezni presnove (KOEDBP) smo pripravili tudi navodila za izvajanje presejanja za VBP v Sloveniji, in informacije za starše, ki so dostopne na spletnem portalu »Redke bolezni« (11).

Celoten proces presejanja tako zajema: informiranje staršev o presejanju novorojencev, ukrepanje v primerih, ko starši zavrnejo testiranje, pravilen odvzem in pošiljanje vzorcev, analizo vzorcev, potrditvena testiranja, nadaljnjo diagnostiko, spremljanje in obvladovanje VBP ter izobraževanje staršev in skrbnikov.

PROTOKOL PRESEJANJA

Kot že v okviru osnovnega, se tudi v okviru razširjenega presejanja za VBP odvzem krvi na filtrirno kartico opravi od 48 do 72 ur po porodu ter hkrati vsaj 24 ur po pričetku hranjenja. Za skupine novorojencev, ki potrebujejo posebno obravnavo (nedonošenčki, novorojenci na intenzivni terapiji), se protokol odvzemov vzorcev izvaja v skladu s posebnimi navodili, ki so izvajalcu dostopni na spletu (11). Če je mogoče, odvzem opravimo pred morebitno predvideno terapijo ali transfuzijo. Otroci z intravensko parenteralno prehrano imajo zaradi njene sestave povišane vrednosti določenih aminokislin, na primer razvejanih, kar je sicer značilno za bolezen javorjevega sirupa. Obenem imajo pogosto znižane koncentracije prostega karnitina. Določena zdravila vplivajo na lažno povišane vrednosti acilkarnitinov, kar je vzrok za lažno pozitivne rezultate presejanja. Enako velja za prehranske dodatke, na primer pri dodatku srednjeverižnih trigliceridov vidimo povišanje številnih acilkarnitinov, ki so pomembni pri prepoznavi motenj v presnovi srednjeverižnih maščobnih kislin. Odvzem vzorca po transfuziji vpliva na vse rezultate presejanja. Pri nedonošenčkih obstaja večja verjetnost tako lažno pozitivnih kakor tudi lažno negativnih rezultatov. V takšnih primerih je pomembno, da poleg predvidenega odvzema testiranje ponovimo še ob odpustu iz bolnišnice oziroma ob koncu zdravljenja. Kartice, ustrezno označene s črtno kodo, naročnik pošlje na KNM, kjer iz polovice kartice opravijo presejalne teste za kongenitalno hipotirozo in fenilketonurijo. Drugo polovico kartice posredujejo na KISLD, kjer opravimo še testiranje za bolezni, zajete v razširjeno presejanje za VBP. Zaradi lažje logistične izvedbe in boljše sledljivosti vzorca smo kartico za odvzem kaplje krvi oblikovali posebej, tako da sta obe polovici kartice označeni z enako črtno kodo, kar omogoča združitev rezultatov obeh laboratorijev v enoten izvid. Vse kartice z nepravilnim odvzemom ali vidno kontaminacijo zavrnemo, porodnišnico pa prosimo za ponovni odvzem.

ALGORITEM OBRAVNAVE REZULTATOV

V okviru razširjenega presejanja za VBP smo pripravili algoritem obravnave rezultatov glede na vrsto rezultata »mejni« ali »pozitivni«, katere opredelitev je odvisna od koncentracije presnovkov, značilnih za določeno bolezen, kot tudi razmerij med njimi. V primeru mejnih rezultatov obvestimo osebje porodnišnice in prosimo za ponoven odvzem vzorca. V primeru pozitivnih rezultatov novorojenčka povabimo na KOEDBP Pediatrične klinike, kjer odvzamemo dodatne vzorce za potrditvene teste, in sicer odvisno od domnevne bolezni. Če je rezultat drugega testiranja mejnega vzorca ponovno mejen, otroka prav tako povabimo na KOEDBP Pediatrične klinike na nadaljnjo diagnostiko (12). Po potrditvi rezultatov KNM in KISLD v LIS-u se kot enoten izvid prenesejo v bolnišnične informacijske sisteme.

Potrditveno testiranje za VBP vključuje analizo acilkarnitinov iz krvnega madeža, organskih kislin v urinu ter aminokislin v plazmi. Pomembna nadgradnja razširjenega presejanja z MS/MS je bila tudi uvedba sekvenciranja DNA naslednje generacije. V ta namen smo pripravili panel 72 genov, ki zajema 18 možnih VBP (17 novih in fenilketonurijo) ter gene za bolezni in bolezenska stanja, ki sicer niso del presejanja, a so za njih značilna povišanja enakih presnovkov kot pri VBP, vključenih v razširjeno presejanje.

Če ugotovimo prisotnost katere od bolezni, ki ni del programa razširjenega presejanja za VBP, se člani konzilija KISLD in KO EDBP odločajo o morebitnih ukrepih za vsak primer posebej. Konzilij se posvetuje tudi o morebitnih spremembah izključitvenih meril ter načrtuje smernice. »

REZULTATI

Do konca leta 2020 smo skupaj testirali 39.324 vzorcev. V prvem letu testiranja (2018) smo pregledali 2.275 vzorcev, od tega je bilo 18 mejnih in 10 pozitivnih rezultatov. V letu 2019 smo testirali 17.819 vzorcev, pri katerih je bilo 284 mejnih in 102 pozitivna. V letu 2020, ko so bile vključene že vse slovenske porodnišnice, smo testirali 19.230 vzorcev, od katerih je imelo 421 mejne rezultate ter 97 pozitivne. Med pozitivnimi rezultati smo z dodatnimi potrditvenimi testi diagnosticirali 12 bolnikov z naslednjimi boleznimi: pomanjkanje zelo dolgoverižne acil-CoA dehidrogenaze (VLCADD) (4 bolniki), pomanjkanje srednjeverižne acil-CoA dehidrogenaze (MCADD) (3 bolniki), pomanjkanje kratkoverižne acil-CoA dehidrogenaze (SCADD) (1 bolnik), izovalerična acidurija (1 bolnik), hiperprolinurija (1 bolnik), citrulinemija (1 bolnik), hipervalinemija – hiperlevcin/izolevcinemija (1 bolnik). Med rezultati močno odstopa visoka pojavnost bolnikov s potrjenim VLCADD, ki je višja celo od sicer najpogostejše motnje v presnovi maščobnih kislin, MCADD (13). Tako visoka pojavnost je lahko značilnost našega prostora, lahko pa se bo po določenem času, ko bo analizirano večje število vzorcev, približala pojavnosti, ki je opisana pri ostalih sosednih državah. Delež zavrnjenih vzorcev zaradi neustreznega odvzema je bil, zaradi dodatnih izobraževanj osebja v porodnišnicah, vsako leto nižji, in sicer od 0,92 % v prvem letu, 0,12 % drugo leto do 0,05 % v letu 2020.

ZAKLJUČEK

Presejanje novorojencev za VBP ima v preventivni medicini izredno pomembno vlogo. Z implementacijo razširjenega presejanja novorojencev smo uspeli prepoznati dodatne posameznike s posebnimi VBP (MCADD, VLCADD, SCADD, …) še pred pojavom kliničnih znakov. Hkrati smo naredili tudi pomemben korak k povezovanju različnih slovenskih bolnišničnih informacijskih sistemov z laboratorijskim informacijskim sistemom in s tem zagotovili boljšo sledljivost podatkov in rezultatov novorojencev, kot tudi neustreznih odvzemov vzorcev. V ta namen smo izvajali tudi dodatna izobraževanja osebja porodnišnic, kar je značilno zmanjšalo število zavrnjenih vzorcev, nepotrebne zamude pri oddajanju izvidov, stres staršev in nenazadnje dodatno obremenitev vseh odgovornih v procesu presejanja. Sočasno z razširjenim presejanjem za VBP smo v rutinsko uporabo implementirali tudi NGS kot potrditveno testiranje, ki poleg potrditve VBP omogoča tudi možnost genetskega svetovanja drugim ožjim družinskim članom. Menimo, da bo genetska diagnostika pri presejanju novorojencev tudi v prihodnosti igrala čedalje pomembnejšo vlogo.

LITERATURA

1. Lanpher B, Brunetti-Pierri N, Lee B. Inborn errors of metabolism: the flux from Mendelian to complex diseases. Nat Rev Genet. 2006 Jun;7(6):449–59.
2. Wilcken B, Ch B, Wiley V, Ph D, Hammond J, Carpenter K. Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry. N Engl J Med. 2003;348(23):2304–12.
3. Chace DH. Mass spectrometry in newborn and metabolic screenig: historical perspective and future directions. J Mass Spectrom. 2009; 44 (2): 163–70.
4. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR, Group AC of MGNSE. Newborn screening panel and system. Genet Med. 2006;8 (Suppl 1): 12S-252S.
5. Wilson J, Jungner Y. Principles and practice of screening for disease. World Heal Organ. 1968; 65 (4): 281–393.
6. Rousseau F, Giguere Y, Berthier MT, Guerette D, Girard JG, Dery M. Newborn screening by tandem mass spectrometry: impacts, implications and perspectives. In: Prasain J, ed. Tandem mass spectrometry – applications and principles. InTech, 2012.
7. Šmon A. Opredelitev kriterijev za razširjeno presejanje novorojencev za vrojene bolezni presnove: doctoral thesis. Ljubljana: University of Ljubljana, Faculty of pharmacy, 2018.
8. Šmon A, Repič Lampret B, Grošelj U, Zerjav Tansek M, Kovac J, Perko D, et al. Next generation sequencing as a follow-up test in an expanded newborn screening program. Clin Biochem. 2018; 52: 48–55.
9. Uradni list RS, št.47/2018 z dne 6.7.2018, https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina/2018-01-2439?sop=2018-01-2439
10. Smon A, Groselj U, Zerjav Tansek M, Bicek A, Oblak A, Zupancic M, et al. Newborn screening in Slovenia. Zdr Var. 2015; 54(2):86-90.
11. Navodilo za izvajanje razširjenega presejanja novorojencev v Sloveniji. Pediatrična klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana. Accessed April 3rd, 2020 at:
12. https://www.redkebolezni.si/ustanova/laboratoriji/ljubljana/sluzba-za--specialno-laboratorijsko-diagnostiko/
13. Repič Lampret B, Remec ŽI, Drole Torkar A, Žerjav Tanšek M, Šmon A, Koračin V, et al. Expanded newborn screening program in Slovenia using tandem mass spectrometry and confirmatory next generation sequencing genetic testing. Zdr Varst. 2020;59(4):256-263.
14. Remec ZI, Groselj U, Drole Torkar A, Zerjav Tansek M, Cuk V, Perko D, et al. VeryLong-Chain Acyl-CoADehydrogenase Deficiency: High Incidence of Detected Patients With Expanded Newborn Screening Program. Front. Genet. (2021);12:648493