

# SCREENING-UL NEONATAL PENTRU FENILCETONURIE – O ȘANSĂ LA VIAȚĂ

Dr. Dana Teodora Anton<sup>1</sup>, Dr. Lelioara Tocan<sup>2</sup>, Dr. Liliana Iliescu<sup>3</sup>,  
Dr. Georgeta Diaconu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinica III Pediatrie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Iași

<sup>2</sup>Laboratorul Spitalului de urgențe pentru copii „Sf. Maria”, Iași

<sup>3</sup>Sănătate publică și management sanitar

## REZUMAT

Screening-ul neonatal reprezintă un important program de sănătate publică preventivă, testul furnizând informații care pot schimba cursul vieții unui copil. Screening-ul pentru fenilcetonurie este exemplul clasic. Autorii prezintă date cu privire la istoricul screening-ului în fenilcetonurie, condițiile de practicare a acestuia, precum și metodologia de lucru.

**Cuvinte cheie:** screening, nou-născut, fenilcetonurie

## INTRODUCERE

Conform OMS, anual se nasc aproximativ 140 milioane de copii. În țările în curs de dezvoltare 5 milioane de copii decedază în prima lună de viață, iar 4 milioane se nasc cu unele boli congenitale. 27-30% dintre copiii care mor din motive necunoscute pot avea diferite boli congenitale de metabolism, la fel ca și 5-15% dintre nou-născuții bolnavi de la Terapie intensivă (1).

Screening-ul neonatal reprezintă un important program de sănătate publică preventivă, util în stabilirea precoce a diagnosticului și în realizarea la timp a intervențiilor medicale la nou-născuții cu boli congenitale rare, în particular în fenilcetonurie (PKU). Testul pentru PKU este primul și cel mai de succes exemplu de testare a populației pentru anumite boli rare, furnizând informații care pot schimba cursul vieții unui copil (2).

Accesul la screening-ul neonatal în societatea modernă este primordial. Totuși, din motive economice sau lipsa disponibilității, nu toți nou-născuții au acces la screening.

## ISTORIC

Screening-ul neonatal a început în 1960, la New York, după ce Dr. Robert Guthrie a realizat un test sanguin simplu pentru PKU (2,3,4,5).

În 1990, o nouă tehnologie de screening a devenit disponibilă: tandem mass spectrometria (MS/MS). Dezvoltarea acesteia de către Edwin Naylor a condus la creșterea numărului bolilor metabolice congenitale potențial detectabile care afectează nivelul sanguin al acizilor organici (6).

În prezent, o altă tehnologie nouă este vizibilă la orizont: screening-ul pentru boli genetice folosind microcipuri bazate pe ADN. Tehnologia cip va permite nou-născuților să fie testați direct, simultan și cu un cost relativ mic pentru mai multe boli (3).

## FENILCETONURIA – ASPECTE GENERALE

Fenilcetonuria clasică este consecința unui deficit total sau aproape total al activității enzimei hepatice – fenilalaninhidroxilaza (PAH).

În practica clinică și tratament, se recunosc următoarele forme de PKU:

Adresa de corespondență:

Dr. Dana Teodora Anton, Universitatea de Medicină și Farmacie „Gr. T. Popa”, Str. Universității, Nr. 16, Iași

- forma clasică, caracterizată prin fenilalanina (Phe) pretratament peste 20 mg%, toleranța zilnică de Phe sub 20 mg/kgc la vârsta de 5 ani, pentru menținerea valorii sanguine a Phe sub 5 mg%, activitate PAH reziduală sub 15% din valoarea normală.
- forma ușoară, în care fenilalanina (Phe) pretratament este peste 10 mg%, toleranța zilnică de Phe peste 25 mg/kgc la vârsta de 5 ani pentru menținerea valorii sanguine a Phe sub 5 mg%, iar activitatea PAH reziduală peste 25% din valoarea normală.
- forma moderată: fenilalanina (Phe) pretratament între 10-20 mg%, toleranța zilnică de Phe între 20-25 mg/kgc la vârsta de 5 ani pentru menținerea valorii sanguine a Phe sub 5 mg%, activitate PAH reziduală între 15-25% din valoarea normală (7).

Clinic, copilul cu PKU este normal la naștere, primele semne apărând în jurul vârstei de 3-4 luni. Principalele simptome clinice sunt reprezentate de retardul mental și tulburările psihice, anomalii neurologice și simptome din partea altor organe. 80% dintre bolnavi au fenotipul blond, iar 20-40% dintre ei pot prezenta eczemă-scleroderma like care se agravează la expunerea la soare. Pacienții pot prezenta un miros neplăcut de transpirație, iar urina emană un miros asemănător urinei de șoarece. Cea mai importantă manifestare prin gravitatea sa este suferința neuro-psihică manifestată prin hipotonie sau hipertonie generalizată, tulburări de statică și dinamică, paraplegie spastică, reflexe osteo-tendinoase exagerate. După vârsta de un an copilul devine hiperactiv, prezentând mișcări involuntare, de balansare, atetoză. În absența tratamentului, deteriorarea mentală este profundă, numai 5% dintre pacienți având QI peste 68. Dezvoltarea somatică este de obicei normală, putându-se constata uneori microcefalie, prognatism maxilar și anomalii dentare (7).

Singura modalitate terapeutică este cea dietetică.

### CONDIȚIILE DE PRACTICARE A SCREENING-ULUI DE MASĂ NEONATAL PENTRU DEPISTAREA FENILCETONURIEI

În 1960, James Wilson și Gunnar Jungner au propus criteriile care trebuie îndeplinite pentru efectuarea screening-ului:

- a. boala inclusă în screening trebuie să reprezinte o problemă importantă de sănătate publică;

- b. istoria naturală a bolii trebuie să fie bine înțeleasă;
- c. boala trebuie să fie detectabilă precoce;
- d. tratamentul precoce trebuie să aibă beneficii mai mari decât în stadiul tardiv;
- e. testul adecvat să fie conceput pentru stadiul precoce;
- f. testul să fie ușor de acceptat de către familie;
- g. trebuie să se cunoască intervalul după care testul poate fi repetat;
- h. riscurile fizice și psihologice trebuie să fie mai mici decât beneficiile;
- i. costul să fie mic (6,8).

Screening-ul pentru PKU este un exemplu pentru acest concept:

- boala afectează 1:10.000 de nou-născuți;
- boala conduce la encefalopatie severă dacă tratamentul eficient nu este administrat;
- există teste specifice, cu mare sensibilitate și cu un cost moderat (6,5 euro/test).

Efectele pozitive ale screening-ului neonatal sunt:

- intervenția precoce conduce la prevenirea dizabilităților și decesului;
- sfatul familial este posibil;
- permite diagnosticul prenatal pentru sarcini ulterioare;
- exclude frustrarea atât pentru părinți, cât și pentru medic (1).

Consecințele negative ale screening-ului neonatal sunt:

- anxietate parentală;
- supraprotecție sau neglijarea copilului;
- sentiment de vinovăție;
- neînțelegeri în familie sau chiar divorț (1).

Reacțiile fals pozitive au impact potențial negativ asupra familiei: cresc stresul parental și riscul de interacțiune anormală între părinte și copil.

Consimțământul părinților pentru screening nu este obligatoriu în toate țările. În funcție de țară și regiune, consimțământul informat poate fi:

- obligatoriu;
- obligatoriu cu opțiunea de a refuza acest test;
- opțional.

Dacă screening-ul este pozitiv, atunci va fi oferit părinților un sfat genetic în vederea unei viitoare sarcini, precum și altor membri din familie identificați ca indivizi cu risc.

Realizarea screening-ului neonatal implică participarea unei echipe multidisciplinare formată din pediatru, genetician, neonatolog, nutriționist, psihoterapeut și neurolog.

## METODOLOGIA SCREENING-ULUI NEONATAL PENTRU FENILCETONURIE

### 1. Recoltarea probelor

Se recoltează o picătură de sânge integral de la fiecare nou-născut.

La nou-născuții normoponderali și hrăniți cu lapte se recoltează în ziua 3-5 de viață (în ziua externării din maternitate sau în ziua premergătoare externării). Dacă se externează în a doua zi de la naștere, se recoltează în această zi.

La prematuri, subponderali sau nou-născuți hrăniți inițial cu soluții glucozate și electrolitice, fără proteine (aminoacizi), se recoltează în ziua 3-5 de la introducerea alimentației lactate.

Picătura de sânge se recoltează prin înțeparea cu ac sau lanțetă de unică folosință a tegumentelor de pe călcâi (la nivelul ariilor laterale ale feței plantare).

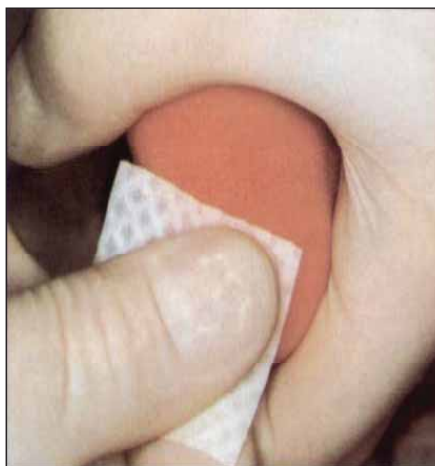
Suprafața de pe care se recoltează se curăță cu alcool, urmând să se facă recoltarea după ce suprafața s-a uscat. Înțepătura nu trebuie să fie mai adâncă de 2 mm deoarece se poate produce lezarea osului. Sângele se recoltează pe hârtie de filtru specială. Se depune câte o picătură de sânge pe suprafețele marcate de cercuri cu diametrul de 15-16 mm (tipărite în prealabil). După înțepătură, prima picătură se îndepărtează. Hârtia de filtru se atinge ușor de o singură picătură mare de sânge care trebuie să îmbibe uniform hârtia de filtru, în toată grosimea ei și pe toată suprafața delimitată de cercul exterior, fără însă a atinge piciorul. Pentru a se realiza acest lucru, este preferabil ca picătura de sânge să fie depusă pe spatele bandelei și să urmărească colorarea în roșu a suprafeței cercului tipărit pe „față”. Trebuie evitată cu strictețe stoarcerea suprafeței înțepate pentru a evita hemoliza sau amestecarea cu alte fluide din țesuturi și nu se pun straturi succesive de picături de sânge, pentru a împiedica formarea crustelor pe hârtia de filtru (Fig. 1, 2, 3, 4).



**FIGURA 1.** Aria hașurată indică zona de siguranță pentru locul de puncționare timp de 3-5 minute.



**FIGURA 2.** Se încălzește locul de puncție.



**FIGURA 3.** Se dezinfectează locul de puncție cu alcool, apoi se șterge cu o compresă sterilă hașurată. Se șterge prima picătură de sânge cu o compresă sterilă. Se lasă să se formeze o altă picătură mare de sânge.



**FIGURA 4.** Se puncționează călcâiul în zonă.

Uscarea picăturilor de sânge de pe bandelele se face în poziție orizontală la temperatura camerei, nu la o sursă de căldură și nu în lumină directă (reșou, calorifer, bec electric, cuptor, soare). Timpul de uscare este de minimum 3 minute. După uscare, bandelele vor fi trimise la laboratorul de referință. Dacă durează mai mult de 3-4 zile până la expediere, vor fi ambalate în săculeți de plastic etanș și păstrate la temperatura camerei.

## 2. Trimiterea probelor la laboratorul de referință

Ritmul trimiterilor va fi săptămânal (de preferință în aceeași zi a săptămânii), indiferent de numărul recoltărilor.

Probele se trimit prin poștă la laboratorul de screening neonatal sau prin curier ocazional (ambulanță sau angajat al instituției sanitare, nu persoane întâmplătoare, care nu au nici o responsabilitate față de instituția expeditoare).

## 3. Evidența nou-născuților/recoltărilor

Maternitățile vor transmite lunar prin e-mail, fax sau poștă, numărul de nou-născuți din luna anterioară. Centrul de referință va face corelarea în timp a numărului de nou-născuți cu numărul de probe trimise.

## 4. Interpretarea rezultatelor

Valorile sub 3 mg% (cut-off) sunt considerate normale.

Valorile peste 3 mg% sunt considerate patologice și impun continuarea investigațiilor (Fig. 5).

Testarea se va repeta imediat dacă:

- specimenul este de proastă calitate, sângele este insuficient, formularul este incomplet sau datele demografice sunt incorecte;
- screening-ul anterior a fost pozitiv.

Repetarea se va face:

- la 14 zile dacă la primul screening testul s-a recoltat la mai puțin de 48 ore de viață (testul poate fi fals negativ pentru că nivelul seric al aminoacizilor poate fi normal la naștere);
- după 24 ore de la ultima doză de antibiotic în cazul nou-născuților care au primit tratament. Dacă nou-născutul este externat înainte de 24 ore, testul se va repeta la externare și la 14 zile.
- la 6 săptămâni de la ultima transfuzie în cazul nou-născuților transfuzați. Nașterile multiple pot modifica rezultatul screening-ului, mai ales dacă s-a diagnosticat sindromul transfuzor-transfuzat (9).

## CONCLUZII

1. Screening-ul neonatal în fenilcetonurie permite diagnosticarea bolii înainte ca orice semn clinic să apară la nou-născut.
2. Responsabilitățile de bază ale clinicienilor includ diagnosticul precoce și corect și managementul clinic al bolnavilor depistați.
3. În viitor screening-ul trebuie să devină universal, astfel ca toți nou-născuții să aibă acces la acest program.

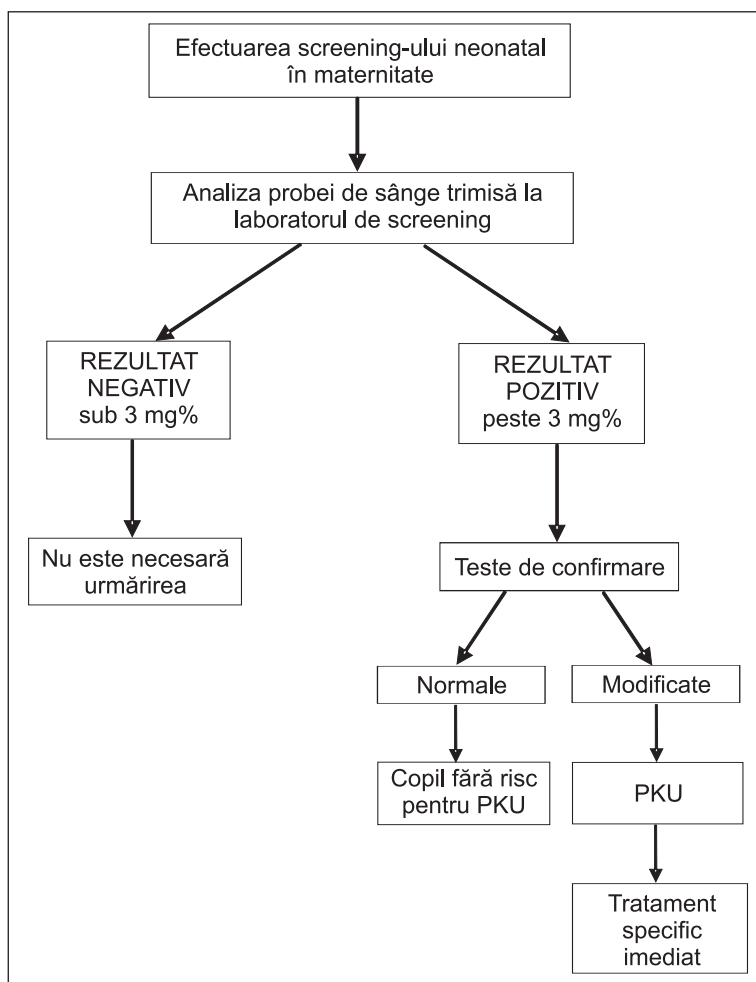


FIGURA 5. Screening-ul neonatal pentru fenilcetonurie – algoritm.



## *Newborn screening for phenylketonuria – a chance at life*

**Dana Teodora Anton<sup>1</sup>, Lelioara Tocan<sup>2</sup>, Liliana Iliescu<sup>3</sup>, Georgeta Diaconu<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*3<sup>rd</sup> Clinic of Pediatrics, “Gr. T. Popa” University of Medicine and Pharmacy, Iasi*

<sup>2</sup>*Laboratory of Children’s Emergency Hospital “Sf. Maria”, Iasi*

<sup>3</sup>*Public Health and Management*

### ABSTRACT

Newborn screening represents an important preventive public health program, the test providing informations that can change the course of the baby’s life. The classic example is newborn screening for phenylketonuria. The authors present dates about the history of the screening for phenylketonuria, requirements for performing the screening and the working methodology.

**Key words:** screening, newborn, phenylketonuria

### BACKGROUND

According WHO, about 140 million children are born every year. 5 million children die in the first month of life in developing countries and 4 million are born with some congenital anomaly. 27-30% of children who die of unknow reason may have inborn diseases of metabolism, as well as 5-15% of all sick neonates in Intensive Care Units (1).

Newborn screening represent an important preventive public health program, useful in obtaining early diagnosis and in medical interventions in newborns affected with rare congenital disease, in particular in phenylketonuria (PKU). It is the first and perhaps the most successful example of population-wide testing for different diseases, the test providing informations that can change the course of the baby’s life (2).

The classic example is newborn screening for phenylketonuria.

Access to newborn screening is essential in modern society. However, for economic reasons or lack of availability not all newborns have access to screening.

### HISTORY

Newborn screening began in the 1960s in New York after Dr. Robert Guthrie developed a simple blood tewst for PKU (2,3,4).

In the 1990s, a new technique of screening became possible: tandem mass spectroscopy (MS/MS). Its development by Edwin Naylor led to the expansion of inborn errors of metabolism that affect blood levels of organinc acids (5).

In present, another new technology is visible on the horizon: screening for genetic disorders using DNA-based “microchips”. Chip technology will allow newborns to be screened directly, simultaneously, and a relatively low cost for many disorders (3).

### PHENYLKETONURIA – GENERAL ASPECTS

Clasic phenylketonuria is the consequence of a total or almost total deficit of the activity of hepatic enzyme – phelylalaninhydroxilase (PAH).

For the clinical practice and treatment we know these forms of PKU:

- classic form is characterized by phenylalanin (Phe) pretreatment over 20 mg%, daily tolerance of Phe under 20 mg/kg at 5 years of age to maintain the blood level of Phe under 5 mg%, the residual PAH activity below 15% of normal value.
- mild form where phenylalanin (Phe) pretreatment is over 20 mg%, daily tolerance of Phe over 25 mg/kg at 5 years of age to maintain the blood level of Phe under 5 mg%, the residual PAH activity below 25% of normal value.
- moderate form is characterized by phenylalanin (Phe) pretreatment between 10-20 mg%, daily tolerance of Phe between 20-25 mg/kg at 5 years of age to maintain the blood level of Phe under 5 mg%, the residual PAH activity between 15-25% of normal value (7).

Clinic, the child with PKU is normal at birth, the first signs first signs appearing around the age of 3-4 months. The principal clinical symptoms are represented by mental retardation and psychological troubles, neurologic symptoms and simptoms from other organs. 80% of patients have blond pnenotype

and 20-40% of them may present eczema scleroderma-like that gets worse in the sun. The patients may present an unpleasant odor of sweat and urine smell like rat urine. The most important manifestation, by gravity, is neuro-psychological distress: hypotonia or generalized hypertonia, static and dynamic disorder, spastic paraplegia. After 1 year of age the child becomes hyperactive, showing involuntary movements, rocking, atetoză. Tendon reflexes are exaggerated. In the absence of treatment, mental deterioration is profound, only 5% of patients being with IQ over 68. Typically, somatic development is normal and can sometimes be found microcephaly, undershot jaw and dental anomalies (7).

Dietary therapy is the only way.

### CONDITIONS FOR THE USE OF MASS NEWBORN SCREENING FOR DETECTION OF PHENYLKETONURIA

In the 1960s, James Wilson and Gunnar Jungner proposed the criteria that must be met to perform a screening:

- the disease included in screening should be an important health problem;
- the natural history of the condition should be well understood;
- the treatment at an early stage should be of more benefit than at a later stage;
- the suitable test should be devised for the early stage;
- the test should be easy acceptable by family;
- intervals for repeating the test should be determined;
- the physical and psychological risk should be less than the benefits;
- the cost should be low (6,8).

The screening for PKU is a good example for this concept:

- the disease affect 1:10.000 newborns;
- the disease leads to severe encephalopathy if the efficient treatment is not administered;
- there are specific tests, with great sensibility and with a low cost (6,5 Euro/test).

Positive consequences of newborn screening are:

- early interventions lead to prevention of disability and death;
- family counselling possible;
- prenatal diagnosis for next pregnancy;
- avoids frustration for both parents and physicians (1).

Negative consequences of newborn screening are:

- parental agony and anxiety;
- overprotection or neglect of the child;

- feeling of guilt;
- family breakup and divorce (1).

False positive results have potential negative impact on the family: increase parental stress and may increase risk for abnormal parent-child interactions.

Parents' consent for the screening test is not obligatory in all countries. According to countries and regions, a neonatal screening test informed consent may be:

- mandatory
- mandatory with option to refuse the test
- optional.

If the screening test is positive, a genetic counseling is offered to parents in view of a future pregnancy and to other family members identified as individuals at risk.

The achievement of newborn screening involve a multidisciplinary team formed by pediatrician, genetic counselor, neonatologist, nutritionist, psychoterapist and neurologist.

### THE METHODOLOGY OF NEWBORN SCREENING FOR PHENYLKETONURIA

#### 1. Collection of blood samples

It removes a drop of whole blood from each newborn. In normal weight infants fed with milk we harvested on day 3-5 of life (the day of discharge from the maternity or the day before). If they are discharged in the second day of life, the collection is made on this day.

At the premature or underweight infants initially fed with glucose and electrolyte solutions without protein (aminoacids), the collection is made on day 3-5 after the introduction of dairy food.

The drop of blood is collected with a needle prick or a disposable lancet on heel skin (face side of the planting areas). Area that is harvested is cleaned with alcohol before harvesting, the collection being made after the surface has dried. Bite should not be deeper than 2 mm because it can cause bone damage. Blood is collected on special filter paper. They make one drop of blood on the areas marked by circles with a diameter of 15-16 mm (previously printed). After stinging, the first drop is removed. The filter paper is gently touch with a single drop of blood that may be uniform across the entire area enclosed by the outer circle, but not touch his leg. To achieve this, it is preferable that the drop of blood to be deposited on the back of the strip and track surface staining red circle printed on "face". It should be strictly avoided prick surface pressing to prevent hemolysis or mixing with other fluids in the tissues. To avoid the formation of crusts on the filter paper layers do not count the drops of blood (Fig. 1, 2, 3, 4).

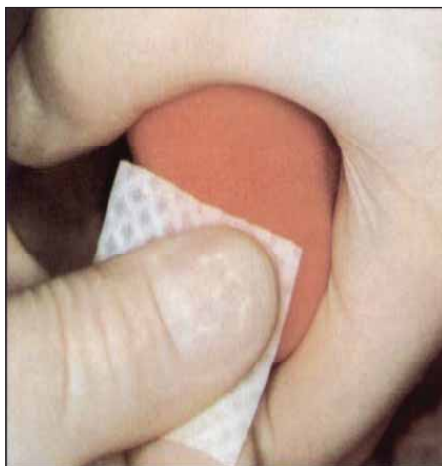
Drying drops of blood on the strip is made at room temperature, not at a source of heat and in direct light (hob, radiator, electric bulb, oven, sun) and horizontally. Drying time is 3 seconds. After drying, the test strips will be sent to reference laboratory. If it takes more than 3-4 days before shipment, the strips will be packed in sealed plastic bags and kept at room temperature.



**FIGURE 1.** Shaded area indicates the area of safety for the puncture site.



**FIGURE 2.** Heat 3-5 minutes the puncture.



**FIGURE 3.** Clean the puncture site with alcohol, then wipe with a sterile buffer. Delete the first drop of blood with sterile buffer. Leave to form another large drop of blood.



**FIGURE 4.** Prick the heel in the area shaded.

## 2. Sending samples to the reference laboratory

The rhythm of shipments will be weekly (preferably on the same day of the week), regardless of the number of harvesting. The samples are mailed to the laboratory for neonatal screening or courier occasionally (rescue or medical institution employee, not random people who have no responsibility for sending institution).

## 3. Newborn record/samples

Maternities will send monthly by e-mail, fax or mail the number of babies borned in previous month. Reference Centre will be linking the number of infants borned with the sample sent.

## 4. Interpretation of results

Values below 3 mg% (cut-off) are normal.

Values above 3 mg% are considered pathological and need further investigation (Fig. 5).

Testing will be repeated immediately if:

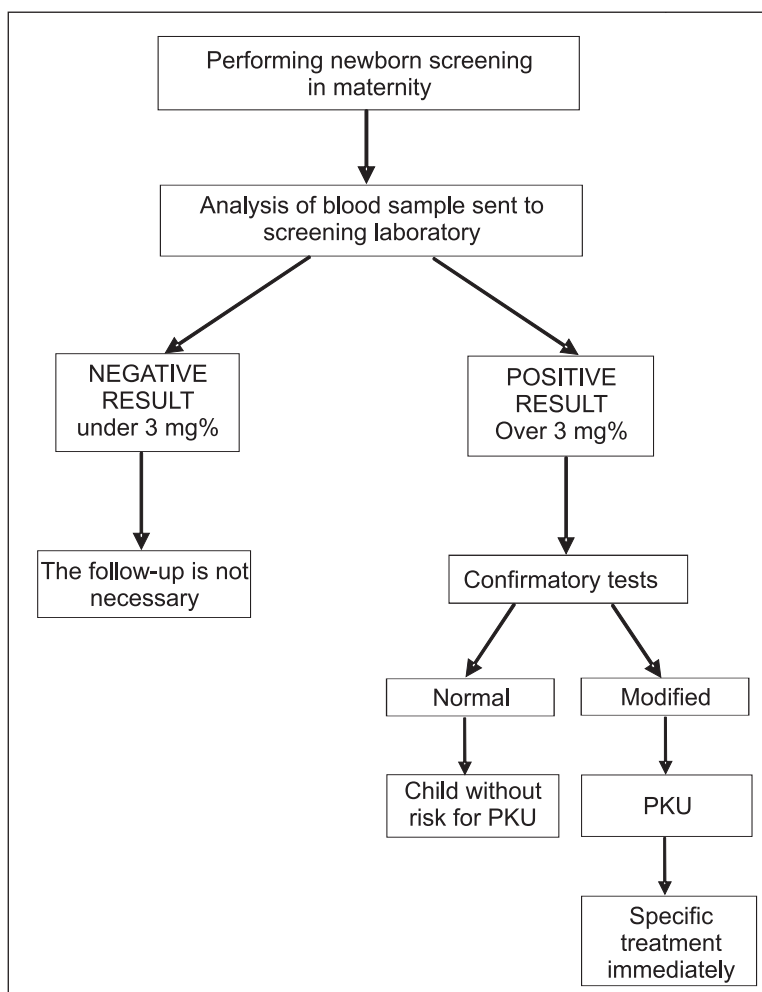
- specimen is of poor quality, the blood is insufficient, the form has incomplete or incorrect demographic data;
- anterior screening was positive.

The test will be repeated:

- after 14-days if the first screening test was collected from more than 48 hours of life (may be false negative test because serum levels of amino acids may be normal at birth);
- after 24-hours after the last dose of antibiotic for infants who have received treatment. If the newborn is discharged before 24 hours, the test will be repeated at discharge and at 14 days of age.
- at six weeks after the last transfusion in the newborn transfused. Multiple births can alter the outcome of screening, especially if transfuser-transfused syndrome was diagnosed (9).

## CONCLUSIONS

1. In phenylketonuria newborn screening allows diagnosis before any clinical sign occur in the newborn.



**FIGURE 5.** Newborn screening for phenylketonuria – algorithm.

2. The basic responsibilities of clinicians include the early and accurate diagnosis and clinical management of patients.

3. In the future newborn screening must become universal, all newborns having access to this program.

## REFERENCES

1. **Jalan A** – Neonatal Screening for IEM. <http://jlanil.tripod.com/NIRMAN/id3.html>
2. **Bradford T, Buechner C, Lloyd-Puryear Michele, Van Dyck P, Mann Marie** – What's New in Newborn Screening? *Pediatr Health* 2008; 2 (4): 411-429.
3. **Baily Mary Ann, Murray T** – Ethics, Evidence, and Cost in Newborn Screening. *The Hastings Center Report* 2008; 38 (3): 23-31.
4. **Dolan S** – Newborn Screening: Update From Fall 2002. <http://www.medscape.com/viewarticle/444625>
5. **Tarini Beth** – The Current Revolution in Newborn Screening. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2007; 161(8): 767-772.
6. **Arn Pamela** – Newborn Screening: Current Status. *Health Affairs* 2007; 26(2): 559-566.
7. **Popescu Antonia, Miu N, Popescu Teodora** – Strategii terapeutice în unele boli metabolice și digestive la copil. Ed. RISOPRINT, Cluj-Napoca 1997: 139-183.
8. **Popescu V, Antrasian Alis, Zamfirescu A** – Screening-ul neonatal în bolile genetice de metabolism. *Revista Română de Pediatrie* 2009; LVIII (4): 369-374.
9. **\*\*\*** – Screening-ul neonatal. [www.pediatria.ro/meniu\\_content.php?](http://www.pediatria.ro/meniu_content.php?)