

Screeningul neonatal pentru fenilcetonurie și hipotiroidism congenital: rezultatele Centrului Cluj, 2011-2015

Carmen Costache¹, Andreea Faur², Antonia Popescu³

¹Disciplina de Microbiologie,

Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu”, Cluj-Napoca, România

²Laboratorul de screening neonatal fenilcetonurie și hipotiroidism,

Spitalul Clinic Județean de Urgență Cluj (SCJUC), Cluj-Napoca, România

³Pediatrie-Neonatologie, Universitatea de Medicină și Farmacie „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, România

REZUMAT

Obiective. Scopul studiului nostru a fost de a evalua starea actuală a screeningului neonatal pentru două erori înnăscute de metabolism, fenilcetonuria și hipotiroidismul congenital (SN-PKU-CH), în partea de nord-vest a României, în centrul regional Cluj (CRCJ), unul dintre cele cinci centre de screening din țară responsabil pentru screeningul din 7 județe.

Material și metodă. Studiul descriptiv transversal este bazat pe datele obținute la screeningul a 101.739 de nou-născuți în perioada 2011-2015. Screeningul se efectuează pentru 2 boli rare: fenilcetonurie (PKU) și hipotiroidism congenital (HC) din spoturi de sânge recoltate pe hârtie de filtru standardizată (DBS). Concentrația fenilalaninei (Phe) și a hormonului de stimulare tiroidiană (TSH) este măsurată prin intermediul unui test imunofluorimetric. Nou-născuții cu valori peste limitele superioare ale testelor (TSH > 18 μ UI/ml sau Phe > 3 mg/dl) sunt rechemati pentru evaluare clinic-biologică și confirmați prin dozarea free-T4 (fT4) sau Phe plasmatică (cromatografie în strat subțire cuplată cu video-densimetrie) înainte de ziua 21 de la naștere, pentru prevenirea encefalopatiei.

Rezultate. Au fost confirmate 10 cazuri cu PKU (~ 1/10.000), 6 cu hiperfenilalaninemie (HPA) și 10 cu HC, toate beneficiind de tratament. Nici unul dintre copii (1-5 ani) nu a dezvoltat handicap neuro-psiomotor fenilpiruvic. Totalul de nou-născuți a fost de 115.779, iar 101.739 au fost testați (87,87%), ceea ce arată că 14.040 nu au fost testați (13,80%). Cea mai frecventă mutație la cazurile confirmate a fost R408W.

Discuții. Județele în care implementarea programului este deficitară sunt: Maramureș 4.811 (20,26%), Bihor 3.349 (11,33%) și Sibiu unde sunt 6.537 (30,65%) de nou-născuți netestați, existând maternități în care programul de screening nu este aplicat.

Concluzii. Procentul mare de nou-născuți netestați face posibilă apariția cazurilor cu defecte neurologice ireversibile. O mai bună organizare a recoltării și transportului, comunicarea către laboratorul de screening a cazurilor confirmate și finanțarea analizei genetice la aceste cazuri ar conduce la eficientizarea programului. Numărul de cazuri confirmate susține dezvoltarea programului în viitor cu cuprinderea eventual și a altor boli rare congenitale.

Cuvinte cheie: screening neonatal, fenilcetonurie (PKU), hipotiroidism congenital, hiperfenilalaninemie (HPA)

INTRODUCERE

Programele de screening neonatal (SN-PKU-CH) care utilizează DBS (dry blood spot) au fost înființate pentru prima dată în 1960 de către Dr. Robert Guthrie. În prezent, SN-PKU-CH este o practică bine stabilită în țările cele mai dezvoltate la nivel mondial, în timp ce în țările în curs de dezvoltare, care reprezintă cea mai mare parte din Eu-

ropa de sud-est, este mai puțin uniform pus în aplicare (1).

În partea de nord-vest a României, programul de SN-PKU pentru fenilcetonurie (PKU) a început în 1 decembrie 1978 în Cluj, adresându-se numai nou-născuților din județul Cluj. Alte județe au fost introduse în SN-PKU în perioada 1995-2000, când au fost testați nou-născuții de la 25 de maternități din

județele Cluj, Bihor, Sălaj, Maramureș și Sibiu. În anul 2000 a fost adăugat în programul SN-PKU-CH screeningul pentru hipotiroidism congenital (HC). Pentru o scurtă perioadă de timp (3 ani), maternitățile din județele Hunedoara și Harghita au trimis probe la centrul regional Cluj (CRCJ). Începând cu 1 ianuarie 2015, 3 județe au fost transferate de la centrul București la CRCJ: Harghita, Sălaj și Satu-Mare. În prezent, CRCJ efectuează screeningul cu probe primite de la 35 de maternități situate în 7 județe. În anul 2011 a fost înființat în România registrul național PKU.

Rezultatele dintr-un sondaj și studii complementare (2,3) au evidențiat faptul că, deși larg răspândit, SN-PKU-CH nu este încă realizat la toți nou-născuții, în unele țări din Europa (inclusiv Bulgaria și România) cu programe de SN-PKU-CH implementate, până la 10% din nou-născuți nefiind testați (1). Oricum, în ultimii 4 ani numărul de nou-născuți care scapă testării a scăzut semnificativ.

OBIECTIVE

Scopul acestui studiu este de a prezenta rezultatele programului de SN-PKU-CH pentru boli rare, PKU și HC, la nivelul CRCJ: numărul și procentul de nou-născuți testați vs. netestați în fiecare județ, în fiecare an; rata cazurilor pozitive la screening și rata cazurilor confirmate de PKU, HPA (hiperfenilalaninemie) și HC în fiecare județ. În același timp, vom prezenta problemele cu care ne confruntăm în organizarea și punerea în aplicare a acestui program la nivelul centrului nostru regional.

METODE

Studiul este unul descriptiv transversal. Materialul este reprezentat de cohorta nou-născuților testați în perioada 2011-2015 din maternitățile situate în nord-vestul țării, 4 județe (Cluj, Bihor, Maramureș, Sibiu) și de la alte 3 județe transferate la centrul nostru începând cu data de 1 ianuarie 2015 (Satu-Mare, Harghita și Sălaj). Numărul de nou-născuți testați din aceste maternități a fost 101.739.

Pachetul de screening pentru tulburările congenitale include 2 boli: PKU și hipotiroidismul congenital HC.

Metodele efectuate în centrul nostru sunt metoda cu ninhidrină pentru PKU și fluorescența rezolvată în timp (fluoroimunoanaliza) pentru TSH (hormonul de stimulare tiroidiană).

Testele sunt efectuate semi-automat, cu o linie dedicată care utilizează un puncher automat, un incubator cu agitator pentru microplăci, un washer și

un cititor de fluorescență (Anthos Labtec Instruments, Salzburg – Austria, Zenyth 3100 detector multimode). Cititorul folosește o măsurătoare cu fluorescență rezolvată în timp (TRF) pentru cuantificarea TSH-ului și a intensității fluorescenței de top pentru PKU. Unitățile de fluorescență măsurate sunt transferate on-line pe computer și calculate în termeni de concentrații.

Metoda cu ninhidrină pentru PKU se bazează pe creșterea fluorescenței fenilalanină – ninhidrină, produsul de reacție a dipeptidei L-leucil-L-alanină. Metoda măsoară fenilalanina cantitativă în prezența altor aminoacizi, folosind o lungime de undă de 390 nm pentru excitație și o lungime de undă de 486 nm pentru emisie (Kit Neonatal Phenylalanine NP-1000/NP-4000).

Analiza imunofluorometrică pentru hTSH este o analiză fluoroimunometrică bazată pe tehnica sandwich directă în care doi anticorpi monoclonali (de la șoareci) sunt îndreptați către situsurile antigenice distincte ale hormonului (DELFLIA neonatal hTSH). Standardele, controalele și probele de testare conținând TSH reacționează simultan cu anticorpii monoclonali imobilizați către situsul antigenic specific și anticorpi monoclonali marcați cu europiu (către un situs antigenic diferit situat parțial pe subunitatea β). Ionii de europiu din anticorpii marcați sunt disociați în a doua etapă și formează chelați fluorescenți. Fluorescența în fiecare godeu este apoi măsurată, fiind proporțională cu concentrația de TSH în probă (4,5).

În screening valorile limită sunt utilizate cu scopul de a detecta rezultatele anormale, care disting între nou-născuții eutiroidieni și hipotiroidieni (9-18 μ U/ml eutiroidieni, hipotiroidiene $> 18 \mu$ U/ml, (6) în timp ce pentru PKU valorile limită sunt între 2,1-3 mg/dl, iar probele prezumtiv pozitive sunt cele care depășesc 3 mg/dl.

Pacienții cu valori limită sunt rechemati urgent pentru teste de confirmare. Testul de confirmare este efectuat prin examinare clinică, măsurarea nivelului seric al fT4 (free T4) și TSH pentru HC, respectiv dozarea Phe (5 ml) recoltat pe heparină, la 3 ore după ultima masă a sugarului, prin metoda cromatografiei în strat subțire cuplată cu video densitometrie pentru PKU, pacienții cu valori ale Phe mai mici de 8 mg/dl fiind diagnosticați cu HPA, iar cei cu valori mai mari fiind diagnosticați cu PKU.

REZULTATE

În prezent, SN-PKU-CH se desfășoară în 35 de maternități din 7 județe: Cluj, Bihor, Maramureș, Sibiu, Satu-Mare, Sălaj, Harghita (Fig. 1).

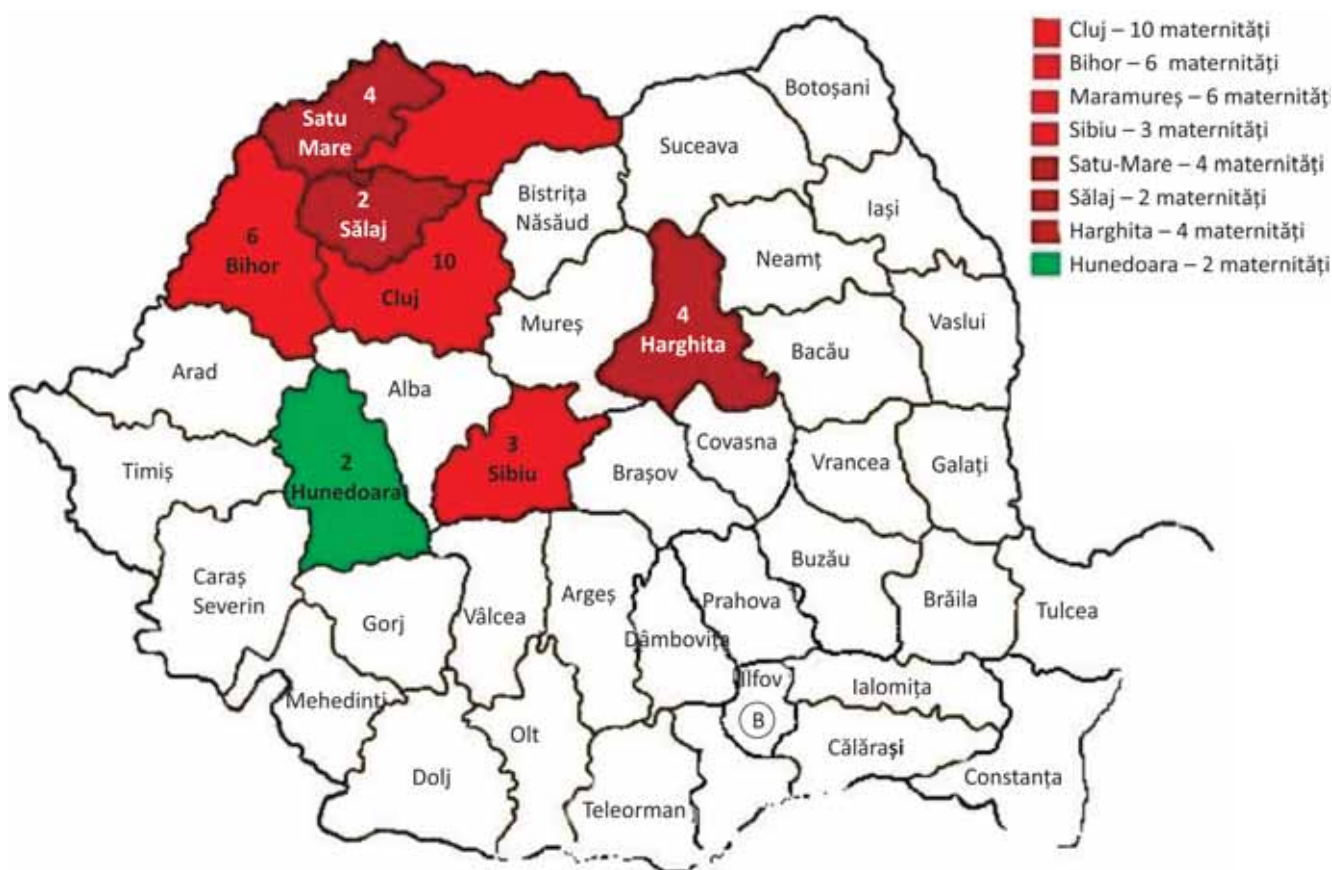


FIGURA 1. Cronologia PNS – introducerea pentru PKU și HC în regiunea de nord-vest a României, 1978-2015
1978 – Cluj

1995-2000 – Cluj, Bihor, Sălaj, Maramureș și Sibiu

2008-2010 – Cluj, Bihor, Maramureș, Sibiu, Hunedoara și Harghita

2011-2014 – Cluj, Bihor, Maramureș și Sibiu

2015 – Cluj, Bihor, Maramureș, Sibiu, Satu-Mare, Sălaj, Harghita

Dintr-un total de 115.779 de nou-născuți, 101.739 au fost testați (87,87%), iar 14.040 (12,13%) nu au fost testați. Numărul total al nou-născuților din fiecare județ a fost obținut din statisticile Direcțiilor de Sănătate Publică (DSP). Numărul și rata de nou-născuți testați și netestați pe județ și pe an este prezentată în Tabelele 1 și 2.

Din numărul total de nou-născuți, la screeningul PKU au fost 227 de teste pozitive, necesitând confirmare. Au fost trimise scrisori către părinți pentru a aduce copilul pentru evaluarea clinică și biochimică și s-au efectuat teste de confirmare. S-au confirmat 10 cazuri cu PKU, în timp ce 6 cazuri au fost diagnosticați cu HPA. Rata de confirmare a fost de

TABELUL 1. Număr nou-născuți testați vs. netestați pe județ

Județ	Nr. nou-născuți vii	Nr. nou-născuți testați	Rată testați %	Nr. nou-născuți netestați	Rată netestați %
Sibiu	21.329	14.792	69,35	6.537	30,65
Maramureș	23.745	18.934	79,74	4.811	20,26
Bihor	29.548	26.199	88,67	3.349	11,33
Cluj	32.693	34.449	*	-	*
Satu-Mare ^a	3.490	2.522	72,26	968	27,74
Harghita ^b	3.041	2.949	96,97	92	3,03
Sălaj ^c	1.933	1.894	97,98	39	2,02

* mamele din mai multe județe vin pentru a naște în Cluj, în timp ce copiii sunt înregistrați pe baza buletinului părinților în județul de reședință (vezi discuții)

a,b,c – județe transferate de la centrul București din 1 ianuarie 2015

TABELUL 2. Număr nou-născuți testați vs. netestați pe an

Anul	Nr. nou-născuți vii	Nr. nou-născuți testați	Rată testați %	Nr. nou-născuți netestați	Rată netestați %
2011	20.580	19.320	93,87	1.260	6,13
2012	21.119	17.988	85,17	3.131	14,83
2013	21.029	18.328	87,15	2.701	12,85
2014	21.987	19.128	86,99	2.859	13,01
2015	34.554	26.975	78,06	7.579	21,94
TOTAL	115.779	101.739	87,87	14.040	12,13

16/227 = 7,05% pentru PKU și HPA. Incidența pentru PKU în centrul nostru a fost de aproximativ 1/11.600 de nou-născuți, dar aproape se dublează dacă includem cazurile cu HPA (6). Confirmarea diagnosticului s-a realizat la toate cazurile în timpul util precizat în literatura de specialitate (maximum 21 de zile de la naștere) pentru introducerea tratamentului dietetic specific pentru prevenirea efectelor negative asupra sistemului nervos central (7).

Valorile limită pentru HC au fost depășite de 242 de nou-născuți și s-au confirmat 10 cazuri cu HC (Tabelul 3).

Nu a existat nici o diferență semnificativă între numărul de cazuri confirmate în funcție de județul de proveniență, așa cum se arată în Tabelul 4.

TABELUL 3. Rata cazurilor confirmate din cele pozitive la screening

Boala congenitală	Probe pozitive la screening	Cazuri confirmate	Rata cazurilor confirmate %
PKU	227	10	4,40
HPA	227	6	2,64
HC	242	10	4,13

TABELUL 4. Cazuri confirmate pe județ

Județ	PKU	HPA	CH
Cluj	2	4	10
Bihor	4	0	*
Maramureș	4	2	*

* Nu ne-au fost comunicate rezultatele testelor de confirmare.

DISCUȚII

Acesta este primul studiu care a evaluat screeningul PKU și HC pentru o perioadă de cinci ani, în 7 județe cu un total de 35 de maternități. În România există cinci centre de SN-PKU-CH situate în: București, Cluj-Napoca, Timișoara, Iași și Târgu-Mureș, acesta fiind cel mai mare număr de centre/țară din sud-estul Europei. Numărul mare de centre în comparație cu alte țări din Europa (una sau două), se explică prin faptul că în România este întâlnit cel mai mare număr de nou-născuți, comparativ cu toate celelalte țări din regiune (1).

Testul screening este gratuit pentru familie, costul per test (2,5 x 2 = 5 euro) fiind asigurat din bugetul alocat de Ministerul Sănătății prin Programului Național de Screening Neonatal.

Confirmarea cazurilor este realizată în alt laborator aparținând SCJUC.

Tratamentul dietetic și monitorizarea cazurilor confirmate se realizează în Clinica Pediatrie III. În acest moment, există 36 de pacienți copii cu PKU (o parte diagnosticați anterior perioadei prezentate) care primesc tratament dietetic și sunt monitorizați de către pediatru. Majoritatea acestor pacienți trimit în laboratorul nostru un DBS pe săptămână sau o dată pe lună.

Problema cea mai critică este screeningul incomplet al nou-născuților din mai multe județe. Procentul de nou-născuți netestați la nivelul CRCJ este de 12,13%, fiind îmbunătățit față de datele raportate din sud-estul Europei în 2014 și 2015 (1,4). Nou-născuții netestați sunt omiși de la diagnostic. Pe de altă parte, există laboratoare private care oferă o gamă largă de teste pentru diagnosticarea precoce a tulburărilor congenitale la care părinții se pot adresa în mod independent. Este la bunul arbitru al părinților comunicarea acestor date către centrul de screening, astfel încât în evidențele noastre acești copii pot figura ca fiind netestați, dar de fapt testarea lor a fost realizată în sistemul privat. Chiar dacă nu avem o comunicare cu privire la numărul de nou-născuți testați de către aceste laboratoare, cei care au fost diagnosticați cu PKU au primit tratamentul dietetic specific, respectiv tratamentul hormonal celor cu CH, și sunt monitorizați în cadrul programului național. Nou-născuții care au fost diagnosticați cu HPA nu necesită tratament, deficitul enzimatic fiind minor. Din cunoștințele noastre, în CRCJ nu există nici un caz diagnosticat între 2011-2015 de la o altă sursă decât laboratoarele din cadru programului național (Laboratorul de Screening Neonatal și Laboratorul de Explorări Genetice din SCJU-Cluj).

O altă problemă importantă este de a face o corespondență între locul în care a avut loc nașterea, respectiv testarea și locul în care nașterea este ra-

portată de către DSP (multe femei care locuiesc în alte județe vin să nască la Cluj). Această inadvertență a dus la situația raportată în Tabelul 1 pentru județul Cluj, unde numărul de nou-născuți este mai mic decât numărul testatelor efectuate. În același timp, putem specula că diferența de nou-născuți (1.756) testați în Cluj poate fi o parte din nou-născuții clasificați netestați în județul lor de reședință (de exemplu, Sibiu cu 6.537 (30,65%), Maramureș cu 4.811 (20,26%) și Bihor 3.349 (11,33% – Tabelul 1). În acest sens, organizarea programului la nivel național și județean ar trebui îmbunătățit deoarece în acest moment există două maternități din Sibiu, care nu aplică programul de screening (~ 830 nou-născuți/an).

Pentru ameliorarea raportărilor în acest program propunem instituirea obligativității informării de către orice laborator (de stat sau privat) a centrului de screening privitor la efectuarea de teste screening sau de confirmare care legate de cele două afecțiuni metabolice acoperite de către programul național.

Calitatea probelor primite de către laboratorul de screening este o altă problemă cu care ne confruntăm. Calitatea proastă a 5,40% din probe se datorează colectării/transportului incorect ceea ce conduce la rezultate fals-pozitive și creșterea numărului de teste de confirmare.

Detectarea anomaliilor genetice în cazurile diagnosticate nu sunt acoperite de programul național. Părinții se pot adresa laboratoarelor private pentru

testare, dar costul testului este prohibitiv pentru un mare număr de familii (598-700 de euro). Cu toate acestea, avem rezultatul în ceea ce privește profilul genetic de la trei cazuri din cele 16 cazuri confirmate. Toate cazurile au avut mutația R408W, cea mai frecventă mutație asociată cu PKU în populația noastră (8,9) iar unul dintre ei a avut mutația S350Y, de origine paternă, pentru care nu se cunosc asocieri.

CONCLUZII

Numărul mare de nou-născuți netestați face posibilă apariția cazurilor cu tulburări neurologice ireversibile. Toate maternitățile din județele arondate centrelor ar trebui să colecteze și să trimită probe la laboratorul de screening.

Absența comunicării de la cazurile confirmate, eventual, în alte județe nu permit o gestionare adecvată a datelor cu privire la eficiența programului de screening.

Organizarea corectă a colectării probei și transportul către laborator va permite diagnosticarea precoce (screening și confirmare).

Introducerea finanțării analizei genetice în costurile acoperite de programul de screening și management al cazurilor confirmate ar permite caracterizarea genetică a cazurilor în aria noastră geografică.

Numărul de cazuri confirmate pledează pentru dezvoltarea viitoare a programului de SN-PKU-CH, cu introducerea altor boli congenitale rare.

Conflict of interest: none declared
Financial support: none declared