

YENİDOĞANLARDA BİYOKİMYASAL TARAMA TESTLERİ

Tijen TANYALÇIN¹

BIOCHEMICAL SCREENING TESTS IN NEWBORNS

Summary: *In many countries, the practice of screening the neonatal population for certain diseases by biochemical testing of dried blood spot has been monitored under nationwide screening program.*

Mass screening test panel varies from region to region based on ethnic, political and financial issues. There is a continuous improvement in the test panel of neonatal screening that has been performed over 50 years and the remarkable development in technology is the cause of continuous better methodology and the regarding improvement.

Key Words: *Biochemical screening testi, newborn*

Özet: *Birçok ülkede yenidoğan topuk kanı örneklerinde belirli hastalıklar için tarama testlerinin yapılması ülke çapında tarama programı olarak gerçekleştirilmektedir. Tarama testleri çeşitleri bölgesel değişim göstermekle birlikte uygulama etnik, politik ve ülke ekonomik koşullarına bağlıdır. Yarım asırlık bir süredir gerçekleştirilmekte olan bu testlerin paneli teknolojiye gelişme ile birlikte sürekli olarak artmakta ve test metotları da sürekli iyileştirilmektedir.*

Anahtar Kelimeler: *Biyokimyasal tarama testi, yeni doğan*

GİRİŞ

Hastalıkları erken dönemde veya presemptomatik dönemde yakalamak fikri çok çeşitli tarama testlerinin gelişimi için ilham kaynağı olmuştur. Birçok testler beklenen yararları sağlayamamış, yetersiz bulunmuştur. Bu nedenle etik ve verimli tarama programlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. (1). Guthrie bakteriyel inhibisyon testi ile fenil ketonüri taraması, 1963 yılında yenidoğanın kalıtsal metabolik hastalıklarının taranmasında halk sağlığı açısından büyük dönemi başlatmıştır. Bu test kitlesel taramaların temelini oluşturmuştur. Bu basit test ile, masraflı olmayan, filtre kağıdı üzerine alınmış topuk kanından yapılan kitlesel taramalara, 1970'li yılların başında Akçaağaç Şurubu hastalığının taranması eklenmiştir. Daha sonra giderek Homosistinüri, ve Galaktozemi bu tarama testleri panelinin gelişmesine katkıda bulunmuştur. (2,3,4,5,6) Bu gelişmeleri konjenital hipotiroidi tayininde T4'ün radyoimmünassay ölçümü izlemiş ve

ardından da konjenital adrenal hiperplazi için 17 hidrokspirogesteron ve 21 hidrosilaz ölçümü takip etmiştir. Konjenital hipotiroidi yüksek sıklıkta gözleendiği için (1/4500) T4 ve yenidoğan TSH kitle taramaları için itici bir güç olmuştur. Günümüzde artık koruyucu veya önleyici pediatrik bakım için yukarıda adı geçen testler yenidoğanın rutin toplum taraması testleri haline gelmiştir. Zaman içerisinde bu programların geliştirilmesinde tarama programlarının geçerliliği, etkinliği ve uygunluğu için belirli kriterler ileri sürülmüş, taramaların başlatılmasından önce bu 17 kriterin sağlanma koşulları incelenmiştir.

Bu kriterler, hastalık, test, tedavi ve tarama programı ile ilgili kriterlerdir. Eğer ülke bazında tarama programı yapılandırılacaksa aşağıdaki kriterler göz önünde bulundurulmalıdır.

1998 de İngiltere ulusal tarama komitesi tarafından belirlenen kriterler kısaca şu şekilde özetlenebilir. (1998) (1)



Hastalık

- Önemli bir sağlık problemi olmalı
- Hastalıkla ilgili epidemiyolojik bilgiler, hastalığın latent döneminden belirgin döneme kadar her türlü gelişim basamakları anlaşılmalı, belirli bir risk faktörü, hastalık belirteci, latent ve erken döneme ait birtakım belirleyiciler olmalı

- Önlenebilir girişimler, uygulanabilir olmalı

Test

- Basit, güvenilebilir, tekrarlanabilir ve geçerli olmalı
- Toplum tarafından kabul edilebilir olmalı
- Tarama yapılan toplum için belirlenmiş bir cut-off değeri olmalı
- Pozitif çıkan sonuçlar alındığında ileri tetkikler konusunda kabul edilmiş bir protokol olmalı

Tedavi

- Erken dönemde yakalanan hastalar için etkin bir tedavi olmalı ve erken tedavinin de geç tedaviye göre hasta sonuçları üzerindeki etkisi olumluluk açısından belirgin ve farklı olmalı.
- Hangi hastaların tedaviye alınacağı konusunda da delillere dayalı bir protokol olmalı
- Hastaların klinik yönden takibi ve iyileşme, tedaviye yanıt, koşulların iyileştirilmesi gibi hasta sonuçlarının analizinin iyi ve doğru olarak sağlıkçılar tarafından tarama programı kapsamına alınmadan önce çok iyi bir şekilde yapılmış olması gerekmektedir.

Tarama programı

- Tarama programının mortalite ve morbiditeyi azalttığına dair son derece güvenilir deliller olmalı
- Toplum ve sağlıkçılar açısından tarama programı test, tanı değeri, tedavi / girişim boyutlarıyla klinik, sosyal ve etik yönden kabul edilebilir olmalı
- Tarama programının faydasının yanında fizyolojik ve psikolojik yönden verdiği zarar son derece önemsiz olmalı
- Tarama programının test, tanı ve tedavi yönünden maliyeti, hastalığın tıbbi bakımı ile kıyaslan-

dığında çok daha ucuz olduğu ekonomik olduğu görülmeli

- Tarama programı bir plan çerçevesinde belirli kalite güvence standartları kılavuzluğunda yürütülüp sürekli kontrol altında tutulmalı
- Test, tanı, tedavi ve tarama programının yönetimi için donanım ve yeterli personel olmalı
- Tedaviyi geliştirme, bakım hizmetleri gibi diğer yönetim koşulları da düşünülmüş ve uygulanabilir olmalı.

İngiltere ulusal tarama komitesi yukarıda adı geçen 17 kriterin karşılanması gerektiğini öne sürmektedir. Komite yenidoğan taramalarında kriterlerin sağlanması ile genel, özenli bir yaklaşım oluştuğunu ve tandem mass spektrometresi ile geniş bir tarama alanının oluştuğuna dikkat çekmiştir.

Tandem Mass Spektrometresi

1907 de J.J. Thompson ilk kez vakum içerisinde pozitif yüklü iyonların ışınlarını göstermiştir. 1919 da Aston iyonların kütle/ yük oranının ölçülebileceğini göstermiştir. İlk olarak 1964 de GC-MS kullanıma açılmış ve 1966 da Tanaka ve arkadaşları idrarda izovaleril glisini tanımlayarak izovalerikasidemi tanısını koymuşlardır. Millington ve arkadaşları ise 1984 hızlı atom bombardıman iyonizasyonunda (FAB), metastabil iyonlardan açığa çıkan fragmanların açıl karnitinin analizinde kullanılabileceğini göstermişlerdir. Bunu takiben elektrospray iyonizasyon (ESI) ile kütle spektrometresinin temeli oluşturularak birçok non volatil metabolitin analizine olanak sağlanmıştır. 1990 lı yıllardan beri tandem mass spektrometre neonatal taramalar için kullanılmaktadır. Özellikle ara metabolitlerin tesbiti ve miktar tayini için önemlidir. Yeni organik asid bozukluklarının keşfine olanak sağlamıştır. Özellikle serebral organik asidüri olarak tanımlanan nörolojik gelişme bozukluğu gösteren olgularda son derece faydalıdır. Tandem mass spektrometre plazma 8(9) kolestanol, çeşitli fosfolipid, glikolipid, protein yapıları, sulfat, glukuronidler ve ilaç oluşturmalarında sentezlenen makromoleküllerin takibinde de kullanılmaktadır (7).

Bu teknik, kağıtlara emdirilmiş kan örneklerinde 2 dakikadan daha az bir süre içinde amino asidlerin ve açilkarnitin profillerinin kantitatif olarak çıkartılmasına yarayan bir tekniktir. Bu teknik ile fenilketonüri (8), akçaağaç şurubu hastalığı (9), homosistinüri (10), MCAD (orta zincir açil-Koa dehidrogenaz) eksikliği (11) tanıları konmuştur ve daha bir çok hastalık tanısında önemli bir yöntemdir (12).

Tandem mass spektrometresi ile plazma açil karnitin profilleri kolaylıkla çıkarılabilmektedir. MCAD eksikliğinde hekzanoik asid ve süberik asid (8 karbonlu dikarboksilik asid) glisin konjugatları, izotop dilüsyon kütle spektrometresi ile kolaylıkla tanınmaktadır (7).

Yenidoğan tarama programı yelpazesinde yer alan biyokimyasal testler aşağıdaki gibi özetlenebilir (13,14,15,16,17):

- **Biotinidaz**
Tam eksiklik
Kısmi eksiklik
- **Konjenital adrenal hiperplazi**
- **Konjenital hipotiroidi**
- **Kistik fibroz**
- **Galaktozemi**
Galaktokinaz eksikliği
Galaktoz -1-fosfat üridil transferaz eksikliği
Galaktoz -4 epimeraz eksikliği
- **Glukoz -6 Fosfat dehidrogenaz eksikliği**
- **Orak hücreli anemi**
- **Beta talassemi**
- **Duchenne muskuler distrofi**
Kreatin kinaz aktivitesi
- **Amino asid bozuklukları**
Akçaağaç Şurubu hastalığı
Fenilketonüri
Sitruilinemi
Argininosüksünik asidüri

Hiperornitinemi,hiperamonyemi, homositrillunüri (HHH) sendromu

- **Açilkarnitin bozuklukları**

- **Organik asidemiler**

Metilmalonik asidemi

Propiyonik asidemi

Isovalerik asidemi

Glutarik asidemi tip I

3 metilkrotonil KoA Karboksilaz eksikliği

3hidroksi 3 metil glutaril KoA liyaz eksikliği

- **Yağ asidi oksidasyonu defektleri**

Orta zincirli açilKoA dehidrogenaz eksikliği

Kısa zincirli açil KoA dehidrogenaz eksikliği

Çok uzun zincirli açil KoA dehidrogenaz eksikliği

3 hidroksi uzun zincir açil KoA dehidrogenaz eksikliği

Genetik danışmanlık ve tedavi için bu hastalıkların tanısı son derece büyük önem taşımaktadır.

Tarama testleri için örnek alınması ve hazırlanması:

Yenidoğan topuk kanı örnekleri

Kan emdirilmiş kağıtların farklı fiziksel özelliklerde olmasından dolayı, testlerin tekrarlanabilirlik ve doğruluğu etkilenmektedir (18,19). Homojen alınmış kan örneklerinde yapılan analizin tekrarlanabilirliği (% CV) % 6'nın altında değildir. % CV, kağıt tipi, kan örneğinin homojen olarak alınmamış olması, hematokrit ve kağıda emdirilen kan hacmi gibi değişken faktörlerden etkilenmektedir (18).

Bu nedenle kan örneğinin alınması için standart prosedürler geliştirilmiştir (20). Kan örneği emdirilen kağıtta örneğin kime ait olduğu, bebeğin beslenme durumu ve örneğin alındığı anda bebeğin yaşı konusunda gerekli bilgiler belirtilmelidir. Örneklerin alınımında ter ile kontaminasyona dikkat edilmelidir. Herbir daire düzgün bir şekilde doldurulmalı, kağıdın



heriki yüzüne kan örneğinin geçmiş olduğuna dikkat edilemelidir. Kan emdirilecek alanlara gereğinden az ya da fazla kan emdirildiğinde hatalı sonuçların alınacağı akılda tutulmalıdır. Yüksek hacimli kitle tarama laboratuvarları akredite laboratuvarlar olmak zorundadır. Laboratuvarlarda uygun kalite kontrol ölçümlerinin yapılıyor olması, eksternal kalite kontrol programlarında yer alıyor olması ideal koşullardır. Ancak eksternal kalite kontrol programlarının standardizasyonu geniş tabanlı yayılım gösteren ve sayıları az olan bu tip laboratuvarla zor gibi görünse de belirli bir düzende yürütülmesi için çaba sarfedilmektedir.

Tarama testi için hastalıkların seçimi

Tarama testleri sadece örnek toplama ve analitik prosedürleri içermez, pozitif sonuç bulunmasından sonra iletişim, öneriler gibi bir hizmet servisinin sunulmasını da zorunlu kılar (21,22). Aracı meslekler, ebeler ve hemşireler bu konuda önemli bir görev üstlenmektedirler.

Günümüzde batı Avrupa ülkelerinde tarama testleri ulusal bir program altında yapılmaktadır. Bölgesel organizasyonlara gidilmektedir. Büyük çaplı, kapasiteleri yüksek merkez tarama laboratuvarlarının çalıştırılması ile hem analizlerin uygun maliyette yapılması hem de denetim, kalite güvence açısından çok nadir görülen bu hastalıklar için tecrübeli elemanların yetişmesine olanak sağlanmış olmaktadır. Tarama testlerinin yararlı olabilmesi için, bilgilerin, verilerin çok iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Tanı konulan vakalar, yanlış pozitif, yanlış negatif çıkan olgular, tanı konulan yaş, tedaviye başlanması, hastanın iyileşmesi gibi veriler değerlendirilmelidir. Yenidoğanlarda taranması uygun olan hastalıkların seçimi konusundaki kriterler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Yenidoğanda taranabilecek hastalıkların sayısı oldukça fazladır. Ancak en sıklıkta tarananlar da Tablo 2 de özetlenmektedir. Yenidoğan tarama testleri için seçim 7kriterleri pek fazla değişmemekle birlikte antenatal tanı koyucu testlerin gündeme gelmesi ile birlikte tarama panellerinde genişleme hızla artmaktadır. Yenidoğan tarama testlerinin geleceğinde DNA ana-

lizleri ve bir damla kandan kalıtsal metabolik hastalıkların tanısı bulunmaktadır. Kistik fibrozda birkaç mutasyonu bir arada saptayan test teknolojisinin bir de MCAD için olduğunu düşünmek hiç de olanaksız değildir. Familial hiperkolesterolemi için de yeni pilot programların geliştirilmesi önerilmektedir.

Tablo 1. Yenidoğan taraması için hastalıkların seçim kriterleri

Hastalığın tanımı	Hastalık tanımlanabilmiş mi?
Taranacak populasyon	Tarama için hangi topluluk uygundur ?
Görülme sıklığı	Bu güne kadar sıklığı belirleme için bir çalışma yapılmış mı?
Takip prosedürleri	Tanıda kullanılabilecek testler var mı?
Tarama metodları	Uygun mu, kolay uygulanabilir mi ve uygun maliyette mi?
Tarama testinin etkilerini gözleme	Hastalığın doğal gidişi tarama testinin prosedürlerinden etkilendi mi?
Giderler	Bu konuda eğitim, deneylerin sürdürülmesi için giderler, takip nasıl yapılıyor?
Kararda zorluk çekilen sonuçlar	Sınır değerler için ne yapılmalı?

Yenidoğan tarama testleri ile tanı konulan hastalıkların listesi bölgesel dağılım, maliyet yarar analiz sonuçları ve seçilen hastalıklarla ilgili önemli/etkili faktörler Tablo 2 de özetlenmektedir.

Testlerin etkinliği ile ilgili karar aşamasında etik, parasal, klinik yararlanım ve politik faktörler birlikte değerlendirilmelidir. Birlikte değerlendirilirse öncelikle tarama profillerinin bölgesel değişiklik gösterdiği kolaylıkla söylenebilir. Tarama programlarında farklılıklar olsa da birçoğu fenilketonüri, konjenital hipotiroidiyi içermektedir. Heriki hastalık için maliyet yarar analizi son derece olumludur. Bu testler diğer tarama testlerinin de program kapsamına alınımında itici güç oluşturmaktadır. Batı Avrupa'da bir çok bölgede kistik fibroz taraması yapılmaktadır. Galaktozemi ve konjenital adrenal hiperplazi ile ilgili tarama testleri tarama yapan bölgelerde programa eklenmektedir. Bu taramaları gerçekleştiren birçok bölgede maliyet yarar tablosu olumlu olmamakla birlikte aminoasidemiler, organik asidemiler ve yağ asidi metabolizmasında karşılaşılan nonasidemik de-

Tablo 2. Yenidoğan taramalarındaki hastalıklar

Hastalık	Tarama kapsamı	Maliyet yarar	Önemli/etkili/şaşırtıcı faktörler
Fenilketonüri	Yaygın	Çok	Yok
Konjenital hipotiroidi	Yaygın	Çok	Belirgin lyod eksikliği
Kistik fibroz	Avusturalya, Avrupanın bir bölümü (özellikle batı bölüm)	Net değil	Taşıyıcı belirlenmesinde artış Yanlış negatiflerde artış
Galaktozemi	Avusturalya, Avrupanın bir bölümü özellikle batı bölüm	Net değil	Uzun dönem komplikasyonlar
Konjenital adrenal hiperplazi	Yeni Zelanda, Amerika ve Avrupanın bir bölümü	Olumlu	Örnek alınma bağlı yanlış pozitiflikler
Amino asidemiler Organik asidemiler	Sınırlı ancak giderek artmakta (Tandem Mass Spektrometre)	Net değil	Hastalığın ılımlı formlarının tesbiti
Hemoglobinopatiler	Sınırlı	Görülme sıklığının yüksek olduğu yerlerde pozitif	Karışık ırk topluluklarında etnik tarama
Biyotinidaz eksikliği	Sınırlı	Net değil	İnsidans düşük
Duchenne Muskuler distrofi	Sınırlı	Olumlu	Tedavi yok

fektler elektrospray iyonizasyon/ tandem mass spektrometresi ile tarama kapsamına alınmaktadır. Daha ufak çaptaki programlar hemoglobinopatiler, biyotinidaz eksikliği ve Duchenne muskuler distrofiyi de kapsamına almaktadır. Tarama programları belirlenirken dikkate alınması gereken konular Tablo 3 de özetlenmektedir.

Tablo 3 Tarama programı oluşturulmasında etkili faktörler

Konu	Faktörler
Hastalığın görülme sıklığı	Topluluğun etnik yapısına bağlı. (Avrupa'da kistik fibroz insidansı yüksek). Çevresel faktörler (lyot eksikliği konjenital hipotiroidi görülme sıklığını yükseltmektedir).
Hastalığa toplumsal yaklaşım	Bazı topluluklarda mental retardasyonu olan bireyler evlerinde çok az bir maliyet ile bakılabilmekteler. Eğer test maliyeti yüksek ise para harcamadan hastanın evde bakımı test maliyeti yüksek olan bu testin program dahiline alınmasını engelleyecek bir çözüm olmaktadır.
Hastalığın takibinde ülkenin ekonomik koşulları	Fakir toplumlarda, hastalığın takibi için yeterli finans olamayabilir. Hastalık tedavi edilemiyorsa, tedavisi olmayan bir hastalığın taranmasının da bir anlamı yok.
Yenidoğan taraması için ülkenin ekonomik koşulları	Tarama programları için giderler bir çok ülkede hükümet tarafından karşılanmaktadır. Programa parasal destek verilip verilmemesi de yine hükümetin kararı ile olmaktadır..
Taramaların ülke bazında uygulanması	Eğer yeni bir test program kapsamına alınacaksa toplum, hükümet desteği, klinik ve laboratuvar kaynakları hertürlü isteksizlik ve engeli aşacak boyutta işbirliği içinde kullanılmalıdır.

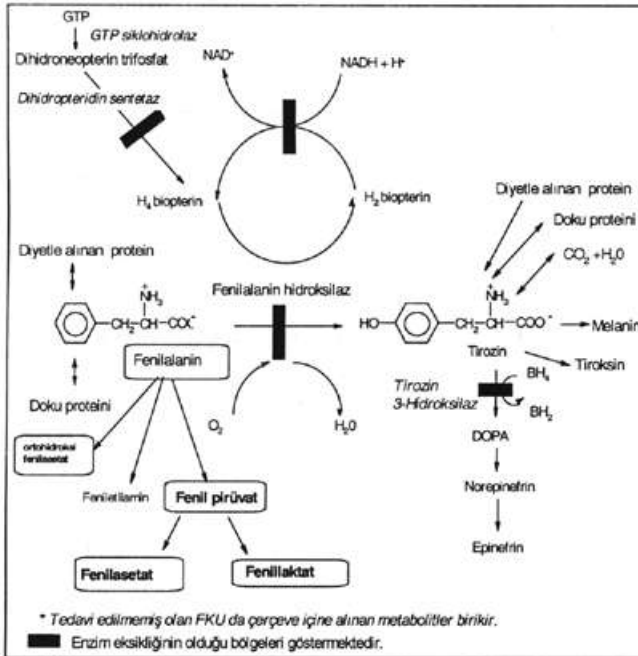
Genetik danışmanlık ve etik boyutları

Yasalarla tarama testlerinin zorunlu kılındığı yerler olmakla birlikte gönüllü programların sayısı da oldukça fazladır. Tarama programlarında maliyet yarar analizlerinin yapılması ve ispatlanması gerektiği konusundaki görüşler oldukça yaygındır. Testin yanlış pozitif çıkması durumunda yaşanacak olan huzursuzluk nedeniyle, hasta veya hasta sahibinin onayının alınması daha doğru olmaktadır. Yenidoğan metabolizma bozuklukları kalıtsal olduğundan, aileye genetik danışmanlık yapılmalı, aileye hasta prognozu hakkında bilgi verilmeli, ve hatta prenatal tanı olasılıkları konusunda aile bilgilendirilmeli ve diğer aile bireylerinin de taranması konusunda da aileye yardımcı olunmalıdır. X'e bağımlı ressesif kadın taşıyıcılar hastalığın (örnek; ornitin transkarbamilaz eksikliği, X'e bağlı adrenolökodistrofi vs.) ılımlı formlarının oğullarında gözlenme riskinin olabileceği konusunda haberdar edilmelidir. Amerika ve Avrupa ülkelerinin bir çoğunda tarama programı içerisinde yer alan hastalıklar ile ilgili kısa bilgiler aşağıda sunulmaktadır.

Fenilketonüri ve hiperfenilalaninemi, fenilalanin hidroksilaz enzim eksikliğine bağlı ortaya çıkmaktadır. Hastalığın bir diğer nedeni fenilalanin hidroksilazın koenzimi olan tetrahidrobiopterin ile ilgilidir. Tetrahidrobiopterin tyrozin ve triptofan hidroksilazın da

koenzimidir. Dihidropterin redüktazda olabilecek defekt veya bioplerin sentezindeki defekt tetrahidrobioplerin eksikliğine neden olur ve fenilalanin hidroksilasyonu bozularak hiperfenilalaninemi ortaya çıkabilmektedir. (Şekil 1)

Fenilketonüri (FKU):



Şekil 1. Fenilalanin metabolizması

Fenilketonüri otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. Görülme sıklığı 1:5000 -1:20.000 arasında değişmektedir. Enzimdeki defekt sonucunda kanda ve vücut dokularında fenil laktat, fenil pirüvat o- hidroksi fenil asetat ve fenilalanin birikir, tirozin düzeyleri azalır.(Şekil 1). Hiperfenilalaninemi tetrahidrobioplerin eksikliğinden de ortaya çıkmaktadır. Fenilketonüri tarama testi dünyada en yaygın kullanılmakta olan testtir. Normalde açlık plazma fenilalanin konsantrasyonları 35-100 mmol/l (0.6-1.7 mg/100 ml) civarındadır. Proteinden zengin diyetle beslenince yemekten 2-3 saat sonra fenilalanin düzeyleri normal değerlerin 2-3 katı olur. Tirozin değerleri de fenilalanine değerleri civarında ya da biraz daha yüksektir. Fenilalanin/tirozin oranı 0.6-15 arasında değişir. Heterozigot taşıyıcılarda oran 1.2-2.5 arasında değişir. ve kanda fenilalanin düzeyleri 200 mmol/l (2.3

mg/100 ml) ye ulaşır. Fenilalanin/tirozin oranı 3 veya üzeri olduğunda hiperfenilalaninemi tanısı konulmaktadır. Fenilalanin hidroksilaz eksikliğine bağlı görülen fenilketonüri tablosunda plazma fenilalanin düzeyleri 1200 mmol/l (20 mg/100ml) değerlerin üzerine çıkmaktadır. Hastalığın klasik formunda psikomotor regresyon belirgindir. Tanı konulduğu takdirde fenilalaninden yoksun diyetle plazma fenilalanin düzeyleri normal sınırlarda tutulabilir (2,17,22). Ne kadar süre diyet yapılması gerektiği konusu tartışmalıdır. FKU'li gebe kadınlarda plazma fenilalanin düzeyleri fötüsün etkilenmemesi için daima kontrol altında tutulmalıdır. Anne kanında 1200 mmol/l üzeri fenilalanin düzeyi olan bebeklerin %90 ı fötal hasarla doğmaktadır.

Kitlesel taramalar Guthrie testi ile yapılmaktadır (6). Bu semikantitatif test bakteriyel inhibisyona dayanmaktadır. Bunun yanısıra fluorometrik ve kolorimetrik metotlar da kullanılmaktadır. Enzimatik reaksiyona dayalı kolorimetrik metotlarda ilk aşamada, fenilalanin, fenilalanin dehidrogenaz ile fenilpirüvik aside dönüştürülür. Okside NAD'den oluşan NADH ın tetrazolium tuzu ile oluşturduğu renkli bir formazan bileşik mikroplate okuyucuda 570 nmde değerlendirilir. Birçok laboratuvar kan fenilalanin düzeylerinin ölçümü için kimyasal metotlara dönmektedirler. Guthrie yöntemine göre tek üstünlüğü fenilalanin düzeylerinin antimikrobiyal ilaçlar veya diğer bakteri gelişimini etkileyecek maddelerle etkileşime girmemesidir. Guthrie testinde yanlış pozitiflik oranı % 5, mikroplate fluorometrik deneylerde analitik hassasiyet 30 mmol/l dir, yanlış pozitiflik oranı ise % 0,6 dır. Tandem Mass Spektrometre de analitik hassasiyet fenilalanin için 3 mmol/L dir. Maliyet yarar analizleri, FKU nun taramada etkin ve yararlığı olduğu sonucunu vermektedir.

Konjenital hipotirodi (CH)

Sık görülen bir hastalıktır (1:4000 canlı doğum). Geçici veya kalıcı CH bazı bölgelerde daha sık karşımıza çıkar. CH geçici olabilir, birkaç hafta içinde bebek ötiroid olabilir. Buna karşın bazı tarama testle-

rinde geç dönemde hatta bir yıl içinde hipotiroidizm gelişen olgular da vardır. Yenidoğan tarama testlerinde yenidoğan tiroid stimulan hormon (nTSH) ölçümüne dayanır. Daha hassas olmasına karşın bu parametre ile tiroksin bağlayıcı globulin eksikliği tesbit edilemez. Eğer ilk 2 gün içinde nTSH bakılırsa, normal bebeklerde doğumu takiben nTSH düzeylerinde hızla bir artış olur ve bu 2 gün kadar sürer (22, 23). Preterm bebekler de düşük tiroksin düzeyleri gösterirler. Maliyet yarar analizleri sonuçları bu testin yapılması yönündedir. Erken tedavi son derece yüz güldürücüdür. Konjenital hipotiroidi taraması ile ilgili nerilen kılavuz (RE9316) Amerikan Tiroid Derneği Komitesi tarafından oluşturulmuştur. <http://www.aap.org/policy/0440/html>

Kistik fibroz

Özellikle batı Avrupa ülkelerinde yaygın bir hastalıktır. Görülme sıklığı 1:2500 dür. En sık letal genetik hastalıklardan biridir. Saf beyaz ırk (Caucasian) görülme sıklığı 1:3200 , diğer etnik gruplara bakarsak Afrika kökenlilerde 1:15000, Asya kökenli 1:31 0000 dir. Hastaların % 75'i yaşamlarının ilk 1 yılında tanı alır, % 92 si ise ilk 10 yılda. % 98 inde terde elektrolit düzeyleri yüksektir. Klinik tablo asemptomatik olgulardan çift taraflı vas defferens yokluğuna, kronik solunum yolu enfeksiyonları ile solunum yetmezliğine, ciddi malabsorbsiyon, siroza kadar giden geniş bir yelpaze sergilemektedir. Erken tedavi yaşam kalitesini yükseltmektedir. Mekonyumda albumin ölçümü, kanda tripsinojen ölçümü eğer yükek ise ter testi yapılması önerilmektedir. Eğer tripsinojen yüksek ise yine DF508 ve diğer mutasyonların moleküler genetik testi panelinde yer alması önerilmektedir Otozomal resessif bir hastalıktır. Kistik Fibroz Transmembran Konduktans Regulator (CFTR) proteini kodlayan gendeki murtasyon sonucu karşımıza çıkar (24). CFTR epitel hücrelerin apikal membranlarında bulunan cAMP bağımlı bir klor kanalıdır. 1000 den fazla mutasyon varlığından söz edilmesine rağmen hastaların % 70 inde DF508 en sık görülen mutasyon tipidir. DF508 fenilalanini kodlayan 3 baz çiftinin delesyonudur. CFTR de yanlış katlanma bükülme olur, ve bu

yanlış konformasyonlu yapı endoplazmik retikulumdan dışarıya çıkıp epitelyal yüzeye ulaşamaz ve sonuçta çok az aktif epitelyal yüzeye ulaşmış CFTR olur. Azalmış CFTR fonksiyonu olarak karşımıza çıkar. Azalmış fonksiyonlar da kendi arasında sınıflandırılmaktadır. Dallanmış işlevi olmayan protein, CFTR nin hedef organelere ulaşmasında bozukluk (DF508), cAMP ye azalmış cevap, klor iletkenliğinde azalma, CFTR nin yarı ömründe azalma gibi. Net sonuç ise defektli klor taşınımı. Ve bunun sonucunda tam olarak aydınlatılmamış akciğer harabiyeti. Terde iletkenlik tayini . Elektriksel iletkenlik ölçütü siemens/cm dir. Tıbbi laboratuvarcılar mmol/L gibi standart kimyasal birimlere alışık olduklarından pratikte siemens/ cm kullanılmaz. mmol/l ye eşdeğer NaCl kullanılır. Ter örneğinin aynı ısıdaki mmol/l NaCl'e eşdeğer iletkenliğe sahip olduğu anlamına gelir. Elektriksel iletkenlik solusyondaki iyonize molekülün molar konsantrasyonuna bağlıdır.



Ter örneklerinde katyon olarak sodyum, potasyum ve az miktarda da amonyum bulunur. Bu katyonları dengeleyen anyonlar da başlıca, klor, laktat ve bikarbonattır. Dolayısıyla iletkenlik total olarak mmol/l cinsinden elektrolite eşdeğerdir. Terde total elektrolit veya terde klor ölçümü kistik fibroz tanısında önemli testlerdir. İletkenliğe Na ve Cl yanında katkıda bulunan diğer anyonlardan dolayı NaCl'e eşdeğer mmol/l iletkenlik Na veya Cl iyonunun gerçek konsantrasyonlarından daima yüksektir. Tanı aralığı da dolayısıyla sadece klor tayini için olan değerden daha farklı olacaktır. Klor konsantrasyonuna göre standardize edilen ter testlerinde >60 mmol/l değerler CF olarak , 40-60 mmol/l CF varyant , tek bir mutasyon olarak tanımlanmaktadır. 3 aydan daha ufak olan bebeklerde >30 mmol/L şüpheli, >40 mmol/l ise CF tanısını kuvvetlendirir. Yetişkinlerde hasta ve sağlıklılar arasında bir çakışma (overlap) bulunmaktadır. İkinci kez bir doğrulama test mutlaka gereklidir. Malnutrisyon ter-



de klor konsantrasyonlarında yanlış pozitif sonuçlara neden olurken tedavi edilmemiş CF li hastalarda ciddi protein –kalorik malnutrisyon ise yanlış negatif sonuçlara neden olmaktadır. Tarama testi olarak iletkenliğin kullanıldığı merkezlerde >50 mmol/l ye eşdeğer iletkenlik pozitif olarak kabul edilmekte ve ileri tetkik gerektirmektedir. Genetik mutasyon analizleri prenatal tanıda kullanılmaktadır. Taşıyıcı anne ve babaların çocuklarında yapılabildiği gibi, CF lu hastaların anne ve babalarında daha sonradan yapılabilir. Mutasyon analizleri genel popülasyonda taşıyıcıların tesbiti için kullanıldığından kitle tarama testi olarak henüz kullanılmamaktadır. (24) Ancak bazı Amerika ve Avusturalya merkezlerinde immunoreaktif tripsinojen kağıda emdirilmiş kan örneklerinde bakılmaktadır. Pankreatik kanal tıkanıklığı oluştuğunda kanda immunoreaktif tripsinojen artar. Ancak hastaların %85-90 na tanı konulabilir. Bu tip bir tarama testinin yararları halen daha tartışmalıdır. Bazı merkezlerin görüşleri ise presemptomatik dönemde tanı konulmasının uzun dönemde hasta sonuçlarına yararlı olacağı şeklindedir.

Kistik fibroz taşıyıcı taraması için önerilen çekirdek mutasyon paneli (25):

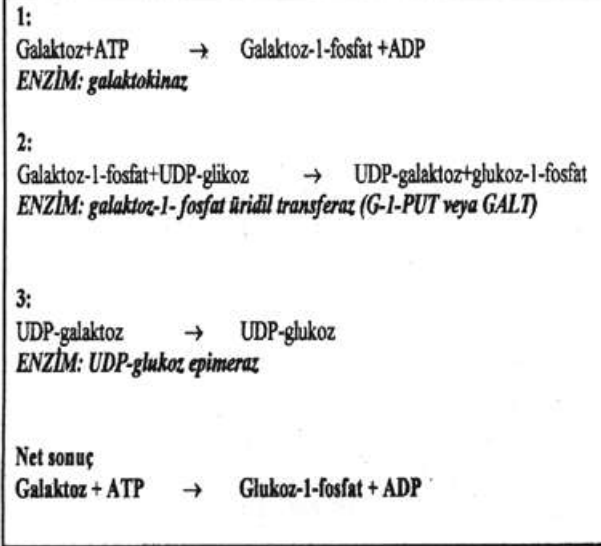
Standart panel

ΔF508, Δ1507,G542X, G551F, W1282X, N1303K, R553X, 621+1G-T, R117H, 1717-1G-A, A455ER560T, R1162X, G85E, R334W, R347P, 711+1G-T, 1898+1G-A, 2184delA, 1078delT, 3849+10kbc-T, 2789+5G-A, 3659delC, I148T, 3120+1G-A (25).

Galaktozemi

Klasik galaktozemi Avrupalılarda 1/30.000 dir. GALT aktivitesinin tamamıyla yokluğuna bağlıdır. Sepsis, hipoglisemi, karaciğer hasarı, beyin hasarı, katarakt görülür. Eritrositlerde enzim eksikliğine bakılabilir. Bebek süt alıyorsa, Galaktoz ve galaktoz-1-fosfatın eritrositlerde birikimi takip edilebilir. NADPH kullanılarak yapılan fluorometrik ve spektrofotometrik ölçümler de substrat ölçümlerinin duyarlılığı daha iyidir. Enzim ölçümleri enzimin saklanma koşullarına ve çevre koşullarına bağlı olarak inaktivasyonu nedeniyle yanlış pozitif olabilmektedir. Erken tanı ve tedavide yenidoğan komplikasyonlar ön-

lenebilmekte ancak konuşma bozukluğu veya ileriki yıllarda kadın hastalara ovarian yetmezlik tanısı da konulmaktadır (22). Galaktozemi genellikle yaşamın ilk haftasında sepsis ve sarılıkla ortaya çıkmaktadır. Bazı hastalar tanı konulmadan önce öldüğü gibi bazı hastalarda da tanı konulsa da kalıcı hasarlar olabilmektedir.



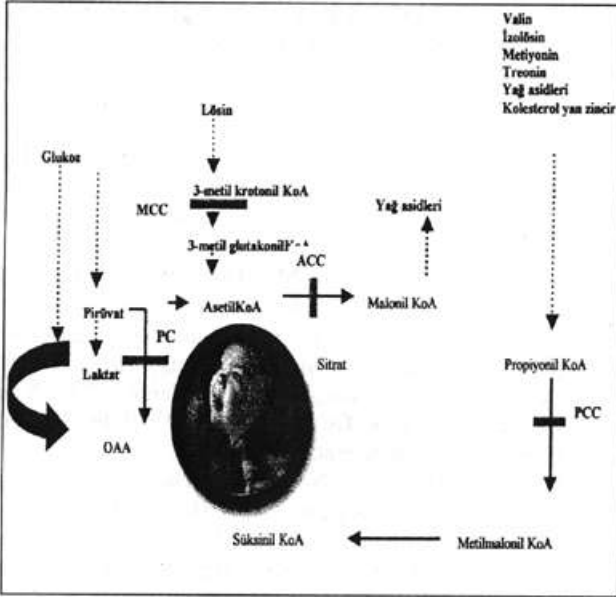
Şekil 2 Galaktoz metabolizmasında yer alan enzimler

Konjenital adrenal hiperplazi

Görülme sıklığı 1:10.000-1:20.000 arasında değişmektedir. Vakaların %95 inden fazlasında 21 hidrok-silaz eksikliğine bağlı androjen üretiminde artış olmaktadır. Kortizol ve aldosteron üretimi ise düşer. Enzim eksikliğinin değişkenliğine bağlı olarak virulizasyonsuz primer amenorenden basit virulizasyona kadar giden tuz kaybettirici hiperkalemi ve hipoglisemi ile seyreden bir tablo oluşmaktadır. Hızlı tanı konması adrenal krizden dolayı ölümün gerçekleşmesini engeller (23). 17- hidroksiprogesteronun immun ölçümlerine dayanan ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde, preterm infantlarda doğumu takip eden ilk 48 saat içinde artmış düzeylerin olması yorumları zorlaştırmaktadır. Bu tarama testi FKU ve CH kadar yaygın bir şekilde tarama programlarına dahil edilmiş değildir.

Aminoasidemiler, organik asidemiler ve yağ asidi metabolizma bozuklukları

Spot idrar ve kanda tanı çalışmaları yıllardır sürmektedir. Elektrospray iyonizasyonlu Tandem MS tekniği ile çeşitli analitlerin belirlenmesi ve miktar tayini yapılabilmektedir. Açıl karnitin düzeyleri, amino asit düzeyleri, görülme sıklığı 1:10.000 olan MCAD eksikliğine tanı konulabilmektedir(18). Ayrıca çoklu karboksilaz eksikliklerinin de tanısı kolaylaşmaktadır (22,23). (Şekil 3).



Şekil 3 Biotine bağlı karboksilazların metabolizmadaki yeri

Şekil 3 de biyotinin kullanım döngüsü özetlenmiştir. Biotinidaz enzimi biyotinin döngüsel kullanımı için gereklidir. Enzim eksikliğinde dışarıdan farmakolojik dozlarda eksiklik düzeyine göre biotin desteği yapılarak tedavi tamamiyle etkin olabilmektedir.

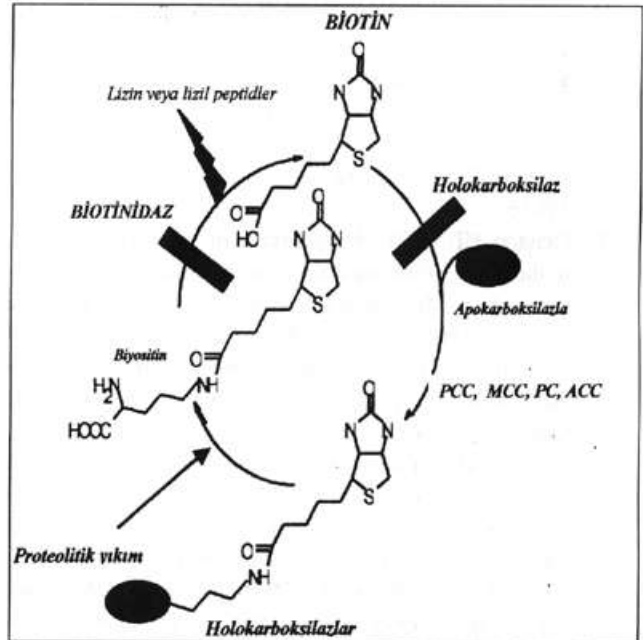
Hemoglobinopatiler

Hemoglobinopatilerden orak hücreli anemi, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz eksikliğinin görülme sıklığı yüksektir. Hemoglobin seperasyonu HPLC, izoelektrik odaklama ile yapılabilmektedir (18). Görülme sıklığı yüksek ise tarama programı içine dahil edilmelidir.

Biyotinidaz eksikliği

Biyotin suda çözünen doğal yiyeceklerde bulunan 4 önemli karboksilazın koenzimidir. (Şekil 3). Bu karboksilazlar glukoneogenez, yağ asidi sentezi, ve

birkaç amino asidin katabolizmasında önemlidirler. Biotinin inaktif apokarboksilazlara bağlanması holokarboksilaz sentetaz ile katalizlenir ve böylelikle aktif holokarboksilazlar oluşur. Biotinin tekrar eldesi, holokarboksilazın proteolitik yıkımı ile mümkündür. Önce lizine bağlı biotin (biositin) oluşur ve biotinil peptidler oluşur (Şekil 4). Biotinidaz biotini bu yapılardan serbestleştirir. Biotin metabolizmasında iki kalıtsal defekt söz konusudur. Holokarboksilaz sentetaz eksikliği ve biotinidaz eksikliği. Holokarboksilaz sentezi bozulduğunda çoklu karboksilaz eksikliği ortaya çıkmakta, klinik olarak asidoz, hipotoni, ataksi, organik asidemiye bağlı nörolojik semptomlar görülmektedir (23). Biotinidaz eksikliği 1/60.000 canlı doğumda bir gözlenmektedir. Bu oranın yarısında ciddi eksiklik söz konusudur. Ciddi eksiklikte enzim aktivitesi normallerin ortalamasının % 10 undan azdır. Tam eksiklik durumunda ise aktivite düzeyi normallerin ortalamasının % 0.05 den de azdır. Kısmi eksiklik normallerin ortalamasının %10-%30 u kadardır. Bunun yanısıra Km varyantları da bulunmaktadır. Km varyanslarında biyositine karşı enzim biyotinidazın ilgisinde azlık söz konusudur (22,23).



PC: pirüvat karboksilaz, PCC propiyonil Koa karboksilaz, MCC: 3 metil krotonil KoA karboksilaz, ACC: asetil KoA karboksilaz

Şekil 4. Biotin kullanım döngüsü.



Tedavi Takibi

Ne kadar yeni tedaviler keşfedilse de , tedavileri takip etmek zorundayız. Yenidoğan metabolizma bozukluğu için mass spektrometrik metotlar geliştirilmiş olsa da bu metotlar enzim replasman tedavisi, t-ransplantasyon ve gen tedavisi sonuçlarının takibinde de kullanılacaklardır.

Beklentiler

Tarama testleri yapan laboratuvarlarda ölçüm yöntemleri 3 ana grup altında toplanabilir. İmmun ölçümler, Tandem Mass spektrometrik ölçüm ve moleküler genetik. Bu tekniklerin uygulanabilmesi ile tanı kolaylaşacaktır. Ancak sadece tanı koymak yeterli değil, tedavide gelişmeler sağlanması sözkonusudur.

KAYNAKLAR

- Green A, Pollitt R.J. Population newborn screening for inherited metabolic disease: Current UK perspectives. 1999. *J. Inher. Metab. Dis* 22:572-579.
- Edwin W. Naylor. Genetic screening of the newborn. 1999. A history of success and a future of promise. *Biotech Lab International* .Vol.4 No.3 5-6.
- Eyskens F. Screening for inborn error of metabolism 1997. PhD Thesis, Antwerp,
- Cowley DM, Bowling FG, McGill JJ, et al.. Adult – onset arginase deficiency 1998 *J Inherit Metab Dis* 21: (6) 677-678.
- Clinical Biochemistry* (Eds). Marshall WJ, Bangert SK. 1995. Chapter 23 Pediatric clinical biochemistry. P: 423-451.
- Guthrie R.. 1992. The origin of newborn screening. 1:5-15.
- Clayton PT. 2001. Applications of mass spectrometry in the study of inborn error of metabolism.
- Chase DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Roe CR, Hofman LF. 1993 Rapid diagnosis of phenylketouria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 39: 66-71
- Chase DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Roe CR, Naylor EW 1995. Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 41: 62-68.
- Chase DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Adam BW, Levy HL. 1996 Rapid diagnosis of homocystinuria and other hypermethioninemias from newborn's blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 42: 349-355.
- Clayton PT, Doig M, Ghafari S et al. 1998 Screening for medium-chain acyl –CoA dehydrogenase deficiency using electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Arch Dis Child* 79: 109-115.
- Barlett K, Pourfarzam M. 1999 Tandem mass spectrometry- the potential. *J Inherit Metab. Dis.* 22: 568-571.
- Biochemistry and Disease . Bridging Basic Science and Clinical Practice.* 1996. Edited by Robert M. Cohn and Karl S. Roth. Williams and Wilkins,
- Lubenow N, Diepenbrock F, Schickling H, Bock D, Heckler R, Sander J. 1994. Phenylketonuria screening with a fluorometric microplate assay. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry* 32: (7) 525-528 jul
- Levefere MF, Verhaeghe BJ, Declerck DM, and De Leenheer AP. 1998 Automated profiling of urinary organic acids by dual –column GS/MS. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 15:311-322,
- Verhaeghe BJ, Levefere MF, De Leenheer AP. 1988 Solid-phase extraction with strong anion-exchange columns for selective isolation and concentration of urinary organic acids. *Clin Chem* 34:1077-1083,
- Levefere MF, Verhaeghe BJ, Declerck DM,, Van Boclaer JF and De leenheer AP. 1989 *Journal Chromatographic Science* 27: 23-29,.
- Clauge A, Thomas A. Neonatal Biochemical screening for disease. 2002 *Clin Chim Acta* 314:99-110.
- Chace DH, Millington DS, Terada N, Kahler SG, Rae CR, Hofman LF. 1993. Rapid diagnosis of phenylketouria by quantitative analysis for phenylalanine and tyrosine in neonatal blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 39:66-71
- NCCLS blood collectionon filter paper for neonatal screening programs : approved standard 3rd edition NCCLS document LA4-A3. 1997 (ISBN 1-56238-334-5) NCCLS , 940 West valley road, Suite 1400, Wayne pennsylvania 19087-1898.
- Therrell BL, Hannon RH, Pass KA , Lorey F, Brokopp C, Eckman J et al. 1996. Guidelines for the retention, storage and use of redual dried blood spot samples after newborn screening analysis. Statement of the council of rehional networks for genetic services. *Biochem mol Med.* 57. 116-24.
- Neonatology. (Editörler) Green A and Morgen Imogen. *Clinical Biochemistry in Medicine Series.* 1993
- Inborn Metabolik Diseases Diagnosis and Treatment .* Editors: Fernandes J, Saudbray M, Berghe Van den G. 3 rd edition. Springer –Verlag Heidelberg 2000.
- The Monitor. Newsletter from the pediatric and Maternal-Fetal Division of AACC. 2002 . 22: 1; 2-4
- Sainato D. Genetic testing for CF going mainstream? *Clin Lab News.* 2002 28;3; 1-4