

# Kriteriji za provođenje drugostupanjskih testova u novorođenačkom probiru na homocistinuriju i nedostatak vitamina B12

---

Begović, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:793745>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



*Ana Begović*

***Kriteriji za provođenje drugostupanjskih testova u  
novorođenačkom probiru na homocistinuriju i  
nedostatak vitamina B12***

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Kseniji Fumić na pruženoj prilici, prenesenom znanju i razumijevanju prilikom izrade diplomskog rada. Također zahvaljujem Ivani Križić, mag. chem., na pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela.*

*Hvala mojim dragim prijateljima koji su mi uljepšali sve godine studiranja i pomogli kad god je bilo teško. Braći, Antoniju i Damiru, hvala na svakom skuhanom ručku, zagrljaju, riječima i porukama ohrabrenja prije ispita i što su uvijek tu kad ih trebam. Posebno hvala mojim roditeljima na ljubavi, razumijevanju i podršci, sve je bilo lakše zbog vas. I na kraju hvala mojoj baki Mandi koja je uvijek pitala i brinula za moju 'školu'.*

## SADRŽAJ

1. Uvod	1
1.1. Rijetke bolesti	1
1.2. Nasljedne metaboličke bolesti	1
1.3. Novorođenački probir	2
1.3.1. Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj	2
1.4. Kriteriji za uvođenje bolesti u nacionalne programe novorođenačkog probira	5
1.5. Homocistinurija	8
1.6. Manjak vitamina B12	9
1.7. Tandemska spektroskopija masa u provođenju novorođenačkog probira	12
1.8. Drugostupanjski testovi u novorođenačkom probiru na homocistinuriju i manjak vitamina B12	14
2. Obrazloženje teme	17
3. Materijali i metode	18
3.1. Analizirani uzorci isječka DBS-a tandemskom spektrometrijom masa u programu NBS-a RH	18
3.2. Metoda korištena za analizu acilkarnitina i aminokiselina iz DBS-a	19
3.2.1. Kratak opis provođenja analize	20
4. Rezultati i rasprava	22
4.1. Postupnik austrijskog NBS programa na manjak B12 vitamina	34
4.2. Postupnik talijanskog NBS programa nakon povišene koncentracije C3	45
4.3. Kriteriji za drugostupanjski test mjerenja Hcy u njemačkom NBS-u	50
4.4. Drugostupanjski test španjolskog programa probira novorođenčadi na manjak vitamina B12	58
5. Zaključci	67
6. Popis kratica, oznaka i simbola	68
7. Literatura	69
8. Sažetak/Summary	73
8.1. Sažetak	73
8.2. Summary	74

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

BASIC DOCUMENTATION CARD

# 1. Uvod

## 1.1. Rijetke bolesti

Rijetke bolesti su skupina bolesti koje zahvaćaju mali broj ljudi u usporedbi s prevalentnim bolestima u populaciji (Richter i sur.,2015). Definicije rijetkih bolesti se u svijetu razlikuju. U Europskoj Uniji pod rijetkim bolestima se podrazumijevaju bolesti koje se javljaju u manje od pet pojedinaca na 10 000 osoba (Richter i sur.,2015). Bolesti se izrazito razlikuju u vremenu nastanka kliničkih simptoma, etiologiji, tijeku bolesti i zahvaćanju pojedinih organa ili organskih sustava. Do sada je poznato između 5000 i 8000 rijetkih bolesti koje pogađaju 6%-8% populacije, što znači da oko 30 milijuna ljudi u Europskoj Uniji boluje od neke rijetke bolesti (<https://www.ema.europa.eu/en>). Rijetke bolesti imaju nisku prevalenciju u populaciji. Većinom se kasno dijagnosticiraju, što zbog neadekvatnog znanja medicinskih stručnjaka, ali i zbog skupe i teže dostupne dijagnostike. Oko 80% rijetkih bolesti je genetičkog porijekla, a neke su uzrokovane degenerativnim promjenama. Kasna dijagnoza može dovesti do nepopravljivih posljedica i komplikacija osnovne bolesti što otežava liječenje i značajno utječe na prognozu bolesti. Simptomi nekih rijetkih bolesti se mogu javiti pri rođenju ili u djetinjstvu. Više od polovica rijetkih bolesti javlja se u odrasloj dobi. Za većinu rijetkih bolesti ne postoje specifične terapije, a dostupni lijekovi su skupi (<https://rijetke-bolesti.com/>).

## 1.2. Nasljedne metaboličke bolesti

Nasljedne metaboličke bolesti su monogenske bolesti. Većinom su to rijetke bolesti koje nastaju kao posljedica smanjene aktivnosti enzima, prijenosnika ili kofaktora, a za posljedicu imaju nakupljanje abnormalnih metabolita u blizini metaboličkog bloka ili nedovoljno stvaranje metaboličkog produkta (Rifai N i sur., 2017). Većina ih se nasljeđuje autosomno recesivno, međutim prisutni su autosomno dominantno te X-vezano nasljeđivanje.

Nasljedni metabolički poremećaju se mogu podijeliti na različite načine. Jedna od mogućih podjela je u tri široke kategorije na temelju učinka koje metabolički poremećaj ima na organizam (Rifai N i sur., 2017):

1. Toksični učinak - metaboliti koji se nakupljaju u tijelu proizvode toksični učinak na različite organe.

2. Nedostatak energije - simptomi ovih poremećaja posljedica su smanjene proizvodnje energije. U nekim slučajevima, pacijenti možda neće imati simptome dulje vrijeme, sve dok se potrebe za energijom ne povećaju zbog npr. gladovanja, bolesti, infekcije ili napornog vježbanja.
3. Poremećaji složenih molekula. Oni su posljedica nedostataka u sintezi ili katabolizmu složenih molekula. Ovi poremećaji su progresivni, neovisni o interkurentnim događajima i nisu povezani s unosom hrane.

Neki češći simptomi nasljednih metaboličkih bolesti uključuju gubitak tjelesne težine, nedostatak energije, umor, nisku razinu glukoze u krvi, visoku razinu amonijaka, oslabljenu funkciju jetre i želuca, povraćanje, proljev, kašnjenje u razvoju, napadaje i druge poremećaje središnjeg živčanog sustava.

Laboratorijska dijagnostika nasljednih metaboličkih poremećaja može biti prenatalna, u sklopu novorođenačkog probira ili kasnije tijekom života nakon postavljene kliničke sumnje.

### 1.3. Novorođenački probir

Novorođenački probir ili novorođenački skrining (engl. *newborn screening*, NBS) je postupak kojim se organizirano i sustavno otkrivaju urođene bolesti u novorođenačkoj populaciji sa svrhom njihovog pravovremenog prepoznavanja ([www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr)). Takav je dijagnostički pristup složen program za čije je uspješno funkcioniranje potrebna odgovarajuća podrška državnih ustanova, koordinirani rad velikog broja zdravstvenih djelatnika kao i suradnja roditelja (Bilandžija i sur., 2018). Probir omogućava ranu detekciju poremećaja koji bi inače prošli neotkriveni u novorođenčadi prije pojave simptoma, ireverzibilnih oštećenja ili u nekim slučajevima i smrti.

#### 1.3.1. Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj

Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj (RH) započeo je 1978. godine probirom na fenilketonuriju, a 1985. dodan je probir na konatalnu hipotireozu. U RH je NBS centraliziran te se provodi se na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir u sklopu KBC-a Zagreb (<https://www.kbc-zagreb.hr/>). U listopadu 2017. godine probir je proširen na još šest bolesti tehnologijom tandemske spektrometrije masa (engl. *Tandem mass spectrometry*, MS/MS): nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze

srednjih lanaca, nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca (izoliran ili kao dio manjka trifunkcionalnog proteina), nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca, nedostatak karnitinskog nosača, izovalerična acidurija, glutarna acidurija tipa I. Od ožujka 2023. godine započeo je pilot program probira na spinalnu mišićnu atrofiju. NBS se odvija pod nadzorom Povjerenstva za novorođenački probir Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske. U RH je NBS obavezna mjera zdravstvene zaštite novorođenčeta.

Uzorci za NBS se uzimaju iz pete novorođenčeta na standardizirani filtar papir (Whatman 903®). Uobičajeno vrijeme uzorkovanja je između 48 i 72 sata starosti djeteta. Ukoliko se novorođenče ranije otpušta iz zdravstvene ustanove uzorak je potrebno uzeti prije otpuštanja pa ponovno između 48 i 72 sata starosti. Ukoliko se radi o nedonoščadi (djeca s porođajnom masom manjom do 1800 grama i/ili gestacijskom dobi manjom od 32 tjedna) uzorak se uzima tri puta: između 48 i 72 sata starosti, s dva tjedna starosti i s četiri tjedna starosti djeteta. Osim uzorkovanja u 32 rodilišta RH, uzorke prikupljaju patronažne sestre, liječnici kod kojih se dijete pregledava (u slučaju rođenja kod kuće) ili educirano medicinsko osoblje primarne zdravstvene zaštite (Bilandžija i sur., 2018). Kartica za NBS se sastoji od dijela u kojem se ispunjavaju osobni podaci o majci i djetetu, te dijela s filtar papirom predviđenim za uzimanje krvi. Svaki krug predviđen je za jednu kap krvi koja odgovara volumenu od oko 50  $\mu$ L krvi. Važno je uz razumijevanje svih drugih preporuka istaknuti da se postupkom mjerenja analita tandemskom spektrometrijom masa uzima uvijek isječak od 3 mm za koji pretpostavljamo da sadržava 3,1  $\mu$ L krvi (ovisno o hematokritu) (Bilandžija i sur., 2018). U izračunu koncentracija pojedinih analita koji se koriste za postavljanje dijagnostičke sumnje u proširenom NBS-u polazi se od pretpostavke da se u svakom isječku nalazi volumen krvi od 3,1  $\mu$ L. Stoga, svako odstupanje od preporučenog načina uzimanja dovodi do znatnih odstupanja u izmjerenim koncentracijama analita i posljedično tome može dovesti do krivih kliničkih zaključaka sa svim mogućim posljedicama po novorođenče (Holub i sur., 2006).



**5005-2903HR Kartica za neonatalni probir**

**LOT** 8212  2022-12

**UPUTE ZA UZORKOVANJE KRVZI ZA NOVOROĐENAČKI PROBIR**

1. Ugrrijati petu prije vađenja i prema potrebi nježnim trljanjem stimulirati cirkulaciju.
2. Obrisati petu vatom umočenom u alkohol.
3. Pričekati da alkohol ishlapi i suhom sterilnom gazom obrisati mjesto uboda kako bi bilo u potpunosti suho.
4. Ubosti petu sterilnom lancetom na neko od mjesta kako je označeno na slici. Za donošenu novorođenčad koristi se lanceta koja ubada 1,8-2mm, a za manju nedonoščad može biti pliće.
5. Prvu kap krvi obrisati.
6. Pričekati da se formira slijedeća velika kap krvi.
7. Formiranu kap krvi prisloniti na središte iscrtanog kruga filter papira na kartici pazeći da koža ne dodirne filter papir.
8. Pustiti da kap natopi cijeli krug na filter papiru pazeći da krv u potpunosti prodre na drugu stranu. Ukoliko jedna kap ne ispuni cijeli krug, nova kap se smije nanijeti na isto mjesto istog kruga jedino ukoliko druga kap dolazi nakon prethodne bez prekida.
9. Treba nastojati da svi krugovi budu potpuno nakapani. Ukoliko je to nemoguće, nakapati ispravno barem 2 kruga.
10. Tako nakapane kartice pustiti da se potpuno osuše, minimalno 3 sata na sobnoj temperaturi bez direktnog utjecaja svjetla, topline i kontakta s drugim karticama.
11. Osušene kartice staviti u plastične folije i što prije poslati u laboratorij u pripremljenim omotnicama.

Kontakt telefon: 01 23 76 412  
e-mail: novorodjenacki.probir@kbc-zagreb.hr

**Nakapati sve krugove samo s jedne strane dok krv ne prodre na drugu stranu, osušiti i spremiti u omotnicu.**

MOLIMO PISATI VELIKIM, TISKANIM SLOVIMA. PAŽLJIVO PROČITATI UPUTE NA POLJEDINI.

**Podaci o majci:**

Prezime majke: \_\_\_\_\_

Djelojčko prezime majke: \_\_\_\_\_

Ime majke: \_\_\_\_\_

Adresa (ulica, broj, mjesto): \_\_\_\_\_

Pozivni broj: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_

**Podaci o ustanovi:**

ZIG USTANOVE - RODIŠTA \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_

**Podaci o djetetu:**

Prezime djeteta: \_\_\_\_\_

Ime djeteta: \_\_\_\_\_

Datum rođenja: \_\_\_\_\_

dan    mli.    god.    sat

Spol: M  Ž

Porodajna masa (kg): \_\_\_\_\_

Gestacijska doba (tjedni): \_\_\_\_\_

**Datum izvršene uzimanja uzorka**

dan    mli.    god.    sat

**Podaci osobe odgovorne za uzorkovanje:**

Datum prvog mliječnog obroka: \_\_\_\_\_

dan    mli.    god.

Infuzija: amniokvadratne \_\_\_\_\_

lipidi \_\_\_\_\_

**Korisne informacije**

Ugrušeno dijete:

Žutica:

Antibiotici:

Transfuzije krvi:

**Slika 1.** Izgled kartice s filter papirrom za uzimanje krvi za novorođenački probir

Kartice se nakon uzorkovanja svakodnevno šalju poštom u Odjel za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC Zagreb. Ukoliko u laboratorij pristigne uzorak sumnjive kvalitete odmah se zatraži novi uzorak. Uzorci se prema preporuci Povjerenstva za novorođenački probir Ministarstva zdravlja RH nakon analize pohranjuju tijekom 5 godina na sobnoj temperaturi, bez utjecaja vlage i direktne sunčeve svjetlosti.

Kako bi se osigurala odgovarajuća osjetljivost probira, bez lažno negativnih uzoraka, neizbježan je određeni postotak lažno pozitivnih uzoraka (McHugh i sur., 2011). Odabir odgovarajućih graničnih vrijednosti (engl. cut-off) za svaki analit omogućuje razlikovanje pozitivnog i negativnog probira. Većoj osjetljivosti probira pridonosi i odabir odgovarajućih primarni i sekundarni biljega za svaku bolest uvrštenu u probir. Za određivanje graničnih vrijednosti potrebno je analizirati minimalno 5000 zdrave terminski rođene djece i za svaki analit izračunati 99-tu percentilu. Granične vrijednosti je potrebno korigirati nakon svakih sljedećih 10 000 uzoraka, a dodatno se trebaju uspostaviti granične vrijednosti za nedonoščad. (Mandour i sur, 2013; De i sur., 2011)

Testovi probira nisu dijagnostički testovi, oni upućuju na novorođenčad koja bi mogla imati određeni metabolički poremećaj i isključuju one koji te poremećaje vjerojatno nemaju. Važno je napomenuti da pozitivan test u NBS-u ne znači sigurno postojanje nekog urođenog poremećaja, potrebno je potvrdno testiranje. Međutim, svaki pozitivan rezultat NBS-a je potencijalno ugrožavajuće stanje za novorođenče. Stoga pedijatri iz tima za NBS obavještavaju kolege pedijatre i/ili obitelj novorođenčeta prema usvojenim postupnicima za svaku bolest uključenu u NBS. Isto tako, dogovaraju daljnje dijagnostičke postupke i daju upute o eventualno potrebnim terapijskim postupcima s novorođenčetom.

#### 1.4. Kriteriji za uvođenje bolesti u nacionalne programe novorođenačkog probira

Od samih začetaka postupka ranog otkrivanja i liječenja bolesti postojala je potreba za smjernicama kojima bi se zdravstveni djelatnici vodili prilikom odabira bolesti ili poremećaja za koje će se provoditi NBS. 1968. godine Svjetska zdravstvena organizacija je objavila *‘Principles and practice of screening for disease’* J.M.G. Wilson i G. Jungner, u kojima autori navode deset kriterija koje bolest ili poremećaj moraju zadovoljiti da bi bili uvršteni u novorođenački probir:

1. Bolest svojom učestalošću treba predstavljati zdravstveni problem
2. Mora postojati učinkovit način liječenja same bolesti
3. Ustanove za dijagnostiku i liječenje bolesti trebaju biti dostupne
4. Bolest se ne može klinički prepoznati u asimptomatskom ili latentnom razdoblju
5. Treba postojati odgovarajući test za njeno otkrivanje
6. Test treba biti prihvatljiv za pojedinca ili populaciju

7. Program bi trebao omogućiti pristup probiru za cijelu ciljanu populaciju.
8. Program treba osigurati informirani izbor, povjerljivost te edukaciju o nasljednoj bolesti ili poremećaju
9. Korist od probira treba biti veća od troškova liječenja slučajeva koji nisu obuhvaćeni probirom
10. Novorođenački probir treba biti kontinuirani, a ne jednokratan proces (Wilson i Jungner, 1968).

Također su određeni kriteriji koje treba zadovoljavati dijagnostička metoda koje se primjenjuje u NBS-u: specifičnost, pouzdanost, osjetljivost, točnost, jednostavnost, automatiziranost, ekonomičnost, izvodljivost, ponovljivost (Dobrow i sur., 2018).

Wilsonovi i Jungnerovi kriteriji za probir su samo smjernice koje su zemlje mogle samostalno interpretirati i prilagoditi svojim nacionalnim programima. To je uzrokovalo razlike u provođenju probira među zemljama pa čak i unutar samih zemalja zbog različitog tumačenja kriterija. Burlina i sur. (2021) su zaključili da postoji potreba za sustavnom evaluacijom poremećaja koji će biti uključeni u NBS. Cilj je bio izgraditi postupnik, temeljen na Wilsonovim i Jungnerovim klasičnim načelima probira, koji omogućuje odgovarajuće bodovanje svakog poremećaja. Ako se za određeni poremećaj izračuna veliki broj bodova te tako zadovolje osnovni kriteriji za uvrštavanje u NBS, potrebno je u svakoj zemlji dodatno razmotriti ekonomske i druge aspekte proširenja probira. Predloženi postupnik mogao bi ograničiti prostor za odluku o odabiru bolesti koje bi se mogle uključiti u nacionalne programe probira, smanjiti nejednakost među europskim zemljama (Burlina i sur., 2021). Autori predloženog postupnika razvrstali su klasične principe u četiri kategorije koje se boduju: stanje (engl. *Condition*), probir (engl. *Screening*), liječenje (engl. *Treatment*) i drugo (engl. *Other*). Oni principi koji su svrstani u kategoriju ‘drugo’ su izbačeni iz postupnika jer nisu mjerljivi. Kategorija ‘stanje’ se odnose na težinu, početak i učestalost poremećaja i može se dobiti maksimalno 6 bodova. Kategorija ‘probir’ se odnose na dostupnost i izvedbu dijagnostičkih testova i nosi najviše 3 boda, a kategorija ‘liječenje’ se odnosi na to da postoji prihvaćen terapijski postupak te se dodatno boduju dostupnost i ishod liječenja i maksimalno nosi 4 boda.

Predloženi postupnik za evaluaciju NBS-a kojeg su osmislili Burlina i sur. (2021) poslužio je za procjenu nasljednih metaboličkih poremećaja koje bi trebalo uključiti u prošireni NBS u

Europi. Jones i sur. (2022) su odabrali 48 nasljednih metaboličkih poremećaja koje su procijenili i bodovali pomoću novog postupnika za NBS. Burlina i sur. (2021) predložili su graničnu vrijednost  $\geq 8.5$  bodova. Na taj način 35 nasljednih metabolički poremećaja zadovoljava Wilsonove i Jungnerove klasične kriterije probira i ulaze u preporuku za uključivanje u nacionalne proširene NBS-ove u Europi (Jones i sur., 2022). Nasljedni metabolički poremećaji za koje se provodi NBS u RH ocijenjeni su pomoću novog postupnika: nedostatak karnitinskog nosača 12.5 bodova, fenilketonurija 11.5 bodova, glutarna acidurija tip I 11.5 bodova, nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca 10.5 bodova, nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca 10 bodova, nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca 9.5 bodova, izovalerična acidurija 8.5 bodova.

Klasičnoj homocistinuriji (OMIM #236200) je ukupno dodijeljeno 11.5 bodova prema novom postupniku za NBS što je svrstava među dobre kandidate za uvođenje u prošireni NBS (Jones i sur., 2022). Prema kategoriji 'stanje' homocistinuriji je ukupno dodjeljno 4.5 bodova. Prema težini bolesti dodijeljeno joj je 0.5 bodova jer postoji ubrzano progresivna forma i 1 bod za to što bolest može imati fatalan ishod. Prema početku stanja dodijeljen joj je 1 bod jer su svi klinički oblici bolesti asimptomatski prvih nekoliko tjedana života i 1 bod jer je više od 50% slučajeva ima fenotip ranog početka bolesti. Prema učestalosti poremećaja dodijeljen joj je 1 bod jer je učestalost  $\geq 1:150\ 000$  i  $< 1:100\ 000$ . Prema kategoriji 'probir' homocistinuriji je dodijeljeno ukupno 3 boda. Za dostupnost probira 2 boda zato što je dostupan test iz DBS-a. Za provođenje probira 1 bod jer test iz DBS-a ima nisku stopu lažno pozitivnih odnosno visoku pozitivno prediktivnu vrijednost. Prema kategoriji 'liječenje' homocistinuriji su ukupno dodijeljena 4 boda, za dostupnost liječenja 1.5 bod jer je dostupna terapije odobrena od strane Europske agencije za lijekove ( engl. *European Medicines Agency*, EMA), a za ishod liječenja dodijeljen joj je 1.5 bodova jer terapijska strategija mijenja prognozu za sve oblike bolesti i 1 bod jer liječenje prije ispoljavanja simptoma rezultira boljim ishodom. NBS za homocistinuriju se provodi u Austriji, Belgiji, Češkoj Republici, Estonij, Finskoj, Mađarskoj, Islandu, Irskoj, Italiji, Sjevernoj Makedoniji, Nizozemskoj, Norveškoj, Poljskoj, Portugalu, Švedskoj, Ujedinjenom Kraljevstvu (Jones i sur., 2022).

## 1.5. Homocistinurija

Homocistinurija je rijetka nasljedna metabolička bolest uzrokovana poremećajem aminokiselina koje sadrže sumpor: metionin (Met), cistein, homocistein (Hcy).

Homocistinurija može biti uzrokovana s najmanje sedam različitih genetskih poremećaja (Rifai N i sur., 2017). Poremećaji metabolizma metionina uzrokuju nakupljanje cisteina i njegovog dimera Hcy. Met, Hcy i cistein povezani su ciklusom metilacije i putem transulfuracije. Pretvorba Met u Hcy nastavlja se putem stvaranja S-adenozil intermedijera, uključujući S-adenozilmetionin, donor metilne skupine u nekoliko reakcija transmetilacije. Hcy se zatim kondenzira sa serinom pomoću cistationin  $\beta$ -sintaze i nastaje cistationin. Djelovanjem cistationaze stvara se cistein koji može sudjelovati u sintezi proteina, glutationa i taurina (Rifai N i sur., 2017). Hcy se također može remetilirati natrag u Met djelovanjem metionin sintaze, enzima koji ima metilfolat i metilkobalamin kao kofaktore. Stoga, nutritivni nedostaci bilo kojeg od ovih mikronutrijenata dovode do nakupljanja Hcy u serumu i urinu (Hannibal i sur., 2016). Poremećaji u bilo kojem od ovih koraka mogu rezultirati homocistinurijom.

Klasična homocistinurija (OMIM #236200, u daljnjem tekstu homocistinurija) je uzrokovana smanjenom aktivnošću cistation  $\beta$ -sintaze (CBS) što dovodi do nakupljanja Hcy u plazmi, a tijekom vremena i u urinu. Prosječna incidencija je 1:300 000 živorođene djece (Rifai N i sur., 2017). U nekim zemljama prevalencija je puno veća, primjerice Katar 1:1 800, Irska 1:65 000, Njemačka 1:17 800, Norveška 1:6 400 (<https://medlineplus.gov/> )

Povišena razina Hcy u plazmi prisutna je u još nekoliko poremećaja remetilacije Hcy: manjak 5,10-metilen-tetrahidrofolat reduktaze, manjak metionin sintaze (cblG), manjak metionin sintaza reduktaze (cblE), manjak 5-metil-tetrahidrofolat-homocistein-metiltransferaza, manjak vitamina B12, te kod poremećaja metabolizma kobalamina (cblC, cblD, cblF i cblJ) (Rifai N i sur., 2017). Klinička manifestacija neliječene homocistinurije ovisi o zahvaćenom genu i težini mutacije; često su to kognitivna oštećenja, napadaji, promjene u oku, zahvaćenost vezivnog tkiva i tromboembolija (Keller i sur., 2019).

Poremećaji remetilacije dijele donekle sličnu kliničku prezentaciju: zaostajanje u razvoju, akutno ili kronično neurološko pogoršanje. Ponekad su prisutni i epileptični napadaji, hipotonija, mikrocefalija, poteškoće s hranjenjem, stomatitis i mikrocefalija (Alodaib i sur., 2011). Kod manjka kobalamina i folata pristuna je klasična klinička slika megaloblastične

anemije. Javljaju se i različiti neuropsihijatrijski poremećaji kod nedostatka kobalamina zbog demijelinizacije perifernih živaca, leđne moždine, lubanje živaca, i mozga (Alodaib i sur., 2011). Na klasičnu homocistinuriju može se posumnjati u NBS temeljem povišene koncentracije Met, dok na poremećaje remetilacije Hcy upućuju vrlo niskie koncentracije Met. Konačna potvrda dijagnoze zahtjeva gensku analizu. Dostupni su i genski paneli za analizu koji sadrže sve poznate gene koji mogu uzrokovati homocistinuriju (Rifai N i sur., 2017).

Pristupi liječenju homocistinurije primarno su usredotočene na ispravljanje biokemijskih abnormalnosti uzrokovanih homocistinurijom, kontrolom razine Hcy u plazmi (Kumar i sur., 2016). Liječenje obuhvaća posebnu prehranu s niskom razinom Met, nadoknadu vitaminom B6 (piridoksin), suplementaciju betainom, te dodatak vitamina B12 u kombinaciji s folnom kiselinom. U pripremi su i druge metode liječenja homocistinurije: korištenje kemijskih i molekularnih šaperona za vraćanje funkcionalno nedostatnog mutantnog enzima CBS ili 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR), pojačano uklanjanje homocistein-tiolaktona iz tijela, smanjenje toksičnosti uzrokovane kovalentnom modifikacijom proteina pomoću homocistein-tiolaktona i korištenje antioksidativnih molekula za zaštitu stanica od oksidativnog stresa izazvanog Hcy (Kumar i sur., 2016).

## 1.6. Manjak vitamina B12

Vitamin B12 ili kobalamin topljiv je u vodi i ljudsko ga tijelo ne može samo sintetizirati te ga je potrebno unositi prehranom. Vitamina B12 najviše ima u hrani životinjskog porijekla kao što su meso, jaja, riba i mlijeko. Metilacija Hcy u Met, kroz pretvorbu donora skupine metiltetrahidrofolata (MTHF) u tetrahidrofolat (THF), i reverzibilno prevođenje metilmalonil-CoA u sukcinil-CoA dvije su metaboličke reakcije čije ispravno funkcioniranje ovisi o statusu vitamina B12 ( Scolamiero i sur., 2014). Vitamin B12 je esencijalni kofaktor za metionin sintazu i metilmalonil-CoA mutazu (Gramer i Hoffmann, 2020).

Apsorpcija vitamina B12 u gastrointestinalnom traktu ovisi o intrinzičnom faktoru, kojeg sintetiziraju parijetalne stanice tijela želuca i o cubam receptorima u distalnom ileumu. U krvi je vitamin B12 vezan za transkobalamin ili haptokorin, čime je samo transkobalamin-vezani vitamin B12 (holoTC) aktivan i dostupan za apsorpciju pomoću CD320 receptora koji se nalazi na većini stanica (Reischl-Hajjabadi i sur., 2022). Vitamin B12 ima glavnu ulogu u

svim tjelesnim stanicama i mnogim organskim sustavima, posebno u tkivima s velikom izmjenom stanica. Neophodan je za razvoj, mijelinizaciju i normalnu funkciju središnjeg i perifernog živčanog sustava te za djelotvornu eritropoezu (Gramer i Hoffmann, 2020).

Manjak vitamina B12 uzrokuje razliku između sazrijevanja citoplazme i jezgre te dovodi do makrocitoze, nezrelih jezgri i hipersegmentacije u granulocitima periferne krvi.

Hipercelularna i displastična koštana srž može se zamijeniti sa znakovima akutne leukemije. Neučinkovita eritropoeza dovodi do intramedularne hemolize i oslobađanja laktat dehidrogenaze, značajki sličnih onima kod mikroangiopatske hemolitičke anemije (Stabler, 2013). Najčešći uzrok nedostatka vitamina B12 u odraslih ljudi je perniciozna anemija.

Perniciozna anemija je autoimuna bolest u kojoj su prisutna autoantitijela usmjerena protiv H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATP aze želučane parijetalne stanice, koja je odgovorna za lučenje kiseline (H<sup>+</sup>) u zamjenu za kalij (K<sup>+</sup>). Gubitak parijetalnih stanica dovodi do smanjenja lučenja intrinzičnog faktora i smanjene apsorpcije vitamina B12 u distalnom ileumu (Rifai N i sur., 2017).

Status vitamina B12 u novorođenčadi pri rođenju ovisi o zalihama kobalamina u majke tijekom trudnoće, funkciji posteljice, gestacijskoj dobi i porođajnoj težini. Novorođenče može biti rođeno s manjkom vitamina B12 ili ga razviti tijekom dojenja. Kod majke uzrok manjka vitamina B12 može biti zbog neprepoznate malapsorpcije ili nutritivnog manjka zbog primjerice gastrične bolesti ili stroge vegetarijanske/veganske prehrane. Novorođenčad s manjkom vitamina B12 je asimptomatska prilikom rođenja. Nedostatak kobalamina kod majke, prijevremeno rođenje i niska porođajna težina povezani su s manjim fetalnim zalihama kobalamina i povećanim rizikom od nedostatka, osobito ako je dojenče isključivo dojeno više od 4 mjeseca prije uvođenja hrane životinjskog porijekla. U većinom dojene djece, razina kobalamina ostaje na razini krvi iz pupkovine 5-7 dana, zatim naglo pada, nakon čega slijedi polagani pad, dostižući najnižu razinu u 6-7 mjesecu života (Hannibal i sur., 2016).

Tipične manifestacije nedostatka vitamina B12 u djece uključuju zastoj u razvoju mozga i cjelokupnog rasta i razvoja, razvojnu regresiju, hipotoniju, poteškoće s hranjenjem, letargiju, drhtanje, hiperiritabilnost. Ako manjak vitamina B12 nije na vrijeme liječen može rezultirati komom ili smrću jer se klinički simptomi ispoljavaju između 4. i 6. mjeseca života (Stabler, 2013.; Gramer i Hoffmann, 2020). Tijekom prvih mjeseci života, razine B12 se smanjuju, dok se razine Hcy i metilmalonske kiseline (MMA) povećavaju, pri čemu su najniže koncentracije B12 i najviše razine Hcy i MMA vidljive između 4. i 6. mjeseca u isključivo dojene djece (Green i sur., 2017). Koncentracije propionil karnitina (C3), Hcy i MMA u krvi povećavaju

se s nedostatkom kobalamina. MMA se obično smatra najosjetljivijim biljekom; u skladu s tim, tijekom posljednjih godina, razine metilmalonske kiseline u urinu i plazmi korištene su za bolju prilagodbu terapije tijekom trudnoće kod žena s manjkom vitamina B12 (Scolamiero i sur., 2014).

Reischl-Hajiabadi i sur. (2022) su proveli studiju u kojoj je novorođenčadi s manjkom vitamina B12 davana terapija B12 u različitim oblicima - dio njih je primio oralnu terapiju, intramuskularnu, kombinaciju oralne i intramuskularne terapije, intravenoznu i kombinaciju intravenozne i oralne terapije. Kod svih oblika liječenja je došlo do povećanja koncentracije vitamina B12, smanjenja koncentracije Hcy i koncentracije MMA u plazmi ili urinu. Nedostatak vitamina B12 u dojenčadi može biti uzrokovan i urođenim greškama u apsorpciji vitamina B12 u gastrointestinalnom sustavu. Diferencijalna dijagnoza u tim slučajevima uključuje nasljedni nedostatak unutarnjeg želučanog faktora (gen GIF), Imerslund-Gräsbeckov sindrom (gen AMN ili CUBN) ili nedostatak transkobalamina (gen TCN2) (Gramer i Hoffmann,2020). Ako se oralnom suplementacijom ne normaliziraju svi parametri statusa vitamina B12, mora se započeti molekularno-genetska obrada i ispitati postojanje urođenih grešaka gastrointestinalne apsorpcije vitamina B12. Isključivo oralnom suplementacijom manjka vitamina B12 moguće je razlikovati privremeni manjak vitamina B12 od genetskih uzroka gastro intestinalne apsorpcije vitamina B12. U urođenim greškama gastro intestinalne apsorpcije vitamina B12 kao što je nasljedni nedostatak unutarnjeg želučanog faktora ili Imerslund-Gräsbeckov sindrom, status vitamina B12 normalizirat će se parenteralnom suplementacijom vitamina B12, ali ne i oralnom suplementacijom. Ako se suplementacija započne parenteralno pod pretpostavkom nutritivnog nedostatka vitamina B12, daljna dijagnostička obrada u vezi s genetskim uzrocima gastrointestinalne apsorpcije vitamina B12 može biti odgođena ili čak zanemarena potencijalno ostavljajući temeljni poremećaj ne dijagnosticiranim (Gramer i Hoffmann,2020). Dijagnostička obrada nedostatka vitamina B12 u novorođenčadi uvijek treba uključivati sveobuhvatnu analizu statusa vitamina B12 i prehrane majke, budući da je nedostatak vitamina B12 u djece ove dobne skupine uglavnom majčinog porijekla (Reischl-Hajiabadi, 2022). Unatoč velikom doprinosu NBS programa ranom prepoznavanju i liječenju IMD-ova, većina neonatalnih slučajeva sa stečenim nedostatkom vitamina B12 otkrivena je kliničkim simptomima, a samo mali broj njih kroz NBS program.



## 1.7. Tandemska spektroskopija masa u provođenju novorođenačkog probira

Masena spektrometrija (MS) je metoda koja se razvila početkom 20. stoljeća. U spektrometru masa fragmentacijom molekula nastaju ioni koje spektrometar analizira prema molekularnoj masi, odnosno prema omjeru mase i naboja ( $m/z$ ).

Maseni spektrometar (MS) se sastoji od 4 osnovna dijela:

1. sustav za unošenje uzorka
2. ionski izvor - koji stvara ione svojstvene ispitivanom uzorku, obično bombardiranjem atoma i molekula elektronima, i u električnom ih polju ubrzava
3. analizator - koji savija putanje različitih iona i tako ih razdvaja ovisno o omjeru njihove mase i naboja ( $m/z$ )
4. detektor - razdvojeni se ioni skupljaju i karakteriziraju

Za analizu složenih smjesa maseni se spektrometar izravno povezuje s plinskim ili tekućinskim kromatografom. Povezivanje MS-a s kromatografskim tehnikama uvijek je bilo poželjno zbog osjetljivijih i specifičnijih svojstava MS-a u usporedbi s drugim kromatografskim detektorima. Povezivanje MS-a s tekućinskom kromatografijom (engl. *liquid chromatography-mass spectrometry*, LC-MS) bio je logičan slijed razvoja metode, ali je napredak u ovom području bio ograničen dugi niz godina zbog relativne nekompatibilnosti postojećih MS ionskih izvora s tekućinskim kromatografima (Pitt, 2009). Razvoj elektrosprej ionizacije i matricom potpomognute ionizacije laserskom desorpcijom 80-ih godina prošloga stoljeća, olakšao je unos uzoraka u LC-MS. Tijekom posljednjih 10-15 godina tekućinska kromatografija tandem masena spektrometrija (engl. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) doživjela je ogroman rast u kliničkim laboratorijima.

Princip rada masenog spektrometra je pretvorba molekule analita u nabijeno (ionizirano) stanje, uz naknadnu analizu iona i svih fragmenata iona koji nastaju tijekom procesa ionizacije, na temelju omjera njihove mase i naboja ( $m/z$ ) (Pitt, 2009). Dostupne su različite tehnologije za ionizaciju i za ionsku analizu, što rezultira mnogim različitim vrstama masenih spektrometara s različitim kombinacijama ova dva procesa. Mogući izvori iona su: elektrosprej ionizacija, kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku, fotoionizacija atmosferskim tlakom.

Za analite niske molekularne težine LC-MS/MS ima veću specifičnost od imunotestova ili visokoučinkovite/tlačne tekućinske kromatografije (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC ) i ima veću propusnost od plinske kromatografije-masene spektrometrije (GC-MS) (Grebe i Singh, 2011).

Za provođenje analize NBS-a koristi se analiza protoka injekcije-tandem masena spektrometrija (engl. *flow injection analysis–tandem mass spectrometry*, FIA–MS/MS). FIA-MS/MS je jednostavna i brza metoda u kojoj se uzorci uvode u MS instrument izravno bez uključivanja bilo kakvog kromatografskog sustava. To omogućuje brzo mjerenje višestrukih analita s visokom osjetljivošću i specifičnošću (Yue X. i sur.,2021.). FIA-MS/MS je dovoljno osjetljiva i za otkrivanje produkata enzimskih testova u probiru za nekoliko lizosomskih bolesti nakupljanja kao što su mukopolisaharidoza tipa I (MPS-I) i Pompeova bolest.

Uvođenje trostrukih kvadrupolnih tandem masenih spektrometara u kliničke laboratorije omogućilo je provođenja NBS-a za više poremećaja jednom analizom isječka DBS. Isječku DBS-a dodaje se interni standard u poznatim koncentracijama. Interni standard je identičan biljegu od interesa, ali je obilježen teškim izotopom što omogućuje kvantifikaciju analita usporedbom omjera MS/MS signala biljega i internog standarda. Interni standard omogućuje pretvaranje MS/MS signala u mole analita. Svaki analit i njegov popratni interni standard otkrivaju se skeniranjem prekursora iona, skeniranjem neutralnih gubitaka i/ili praćenjem višestruke reakcije (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM) koje uključuje filtriranje mase za matične ione u Q1(kvadrupol). Zatim slijedi sudar tih iona s inertnim plinom čime nastaju fragmenti iona u Q2, koji su odabrani prema masi prije detekcije u Q3. U MRM modu, maseni spektrometar kruži kroz popis MRM-ova tako da se svaki analit i interni standard zasebno otkrivaju u brzom slijedu (Gelb i sur., 2022).

Iako takav analitički pristup ima niz prednosti, pozitivna prediktivna vrijednost nekih analita za pojedine bolesti u programu NBS-a je relativno slaba. Stoga je predloženo uvođenje probira druge razine (drugostupanjski test) za određene nasljedne metaboličke poremećaje. Probir druge razine se provodi ako su prvostupanjskim testom izmjerene koncentracije primarnih biljega veće od propisanih graničnih vrijednosti u određenom laboratoriju. Isti DBS uzorci se ponovno analiziraju specifičnijim testovima koji najčešće uključuju LC-MS/MS analize (Pitt, 2009). Prvi drugostupanjski test LC-MS/MS test korišten u programu NBS-a bio je steroidni profil korišten za kongenitalnu hiperplaziju nadbubrežne žlijezde. Mogućnost

veće razlučivosti i osjetljivosti koje pruža LC-MS/MS u odnosu na FIA-MS/MS, kao i sposobnost MS/MS da istovremeno mjeri više biomarkera, doveli su do razvoja i implementacije još nekoliko testova druge razine. Uvođenje drugostupanjskih testova povećalo je specifičnost NBS-a za nasljedne metaboličke poremećaje gdje primarni biljezi imaju nisku pozitivnu prediktivnu vrijednost (Gelb i sur., 2022). Ovakvim pristupom rezultati izvan raspona primarnih biljega za određenu bolest nadopunjuju se mjerenjem specifičnijih sekundarnih metabolita za ciljni poremećaj iz istog uzorka DBS. Rezultati tih analiza smatraju se specifičnijima i temeljem njih se proglašava pozitivan probir za određenu bolest.

## 1.8. Drugostupanjski testovi u novorođenačkom probiru na homocistinuriju i manjak vitamina B12

Dosadašnji rezultati provođenja NBS-a pokazali su da je povećana koncentracija C3 nespecifičan biljeg pri sumnji na metilmalonsku acidemiju, propionsku acidemiju, nedostatak vitamina B12 i homocistinuriju, tablica br.1.

Česti su lažno pozitivni rezultati, što uzrokuje emocionalne stresove obitelji, kao i dodatna financijska opterećenja (Tarini i sur., 2011). Stoga je pri uvrštenju potonjih poremećaja u NBS potrebno uvesti i odgovarajuće drugostupanjske testove.

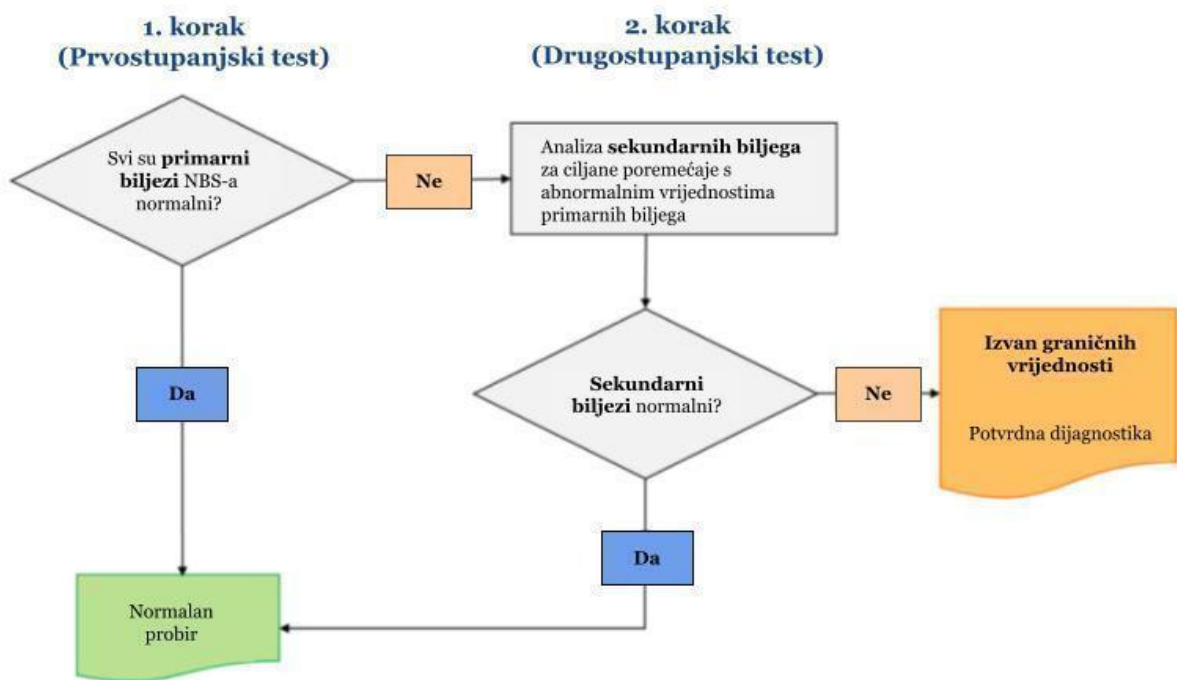
Primarni analiti čije promjene upućuju na homocistinuriju i manjak vitamina B12 su C3, acetyl-karnitin (C2), Met, fenilalanin (Phe). Osjetljivost i specifičnost se dodatno može povećati uzimajući u obzir međusobne omjere primarnih metabolita.

Postoji nekoliko pristupa kako u NBS-u za nasljedne metaboličke poremećaje koji se temelje na mjerenju koncentracije C3 povećati osjetljivost i specifičnost: definiranje graničnih vrijednosti po porođajnoj težini ili dobi, korištenje sekundarnih analita probira Met, heptadekanoil-karnitin (C17), omjeri C3/C2 i C3/slobodni karnitin (C0) i korištenjem post analitičkih alata CLIR (engl. *Collaborative Laboratory Integrated Reports*). CLIR je interaktivna web stranica koju je razvila Klinika Mayo u Rochesteru, Minnesota SAD. CLIR je laboratorijska baza podataka za pomoć u post-analitičkoj analizi, slobodan pristup je omogućen svima koji pridonose dodavanju podataka u bazu podataka.

**Tablica 1.** Očekivane promjene koncentracija drugostupajskih testova nakon mjerenja primarnih biljega C3 i/ili Met (<https://www.mayocliniclabs.com/>)

	Prvostupajski probir		Drugostupajski testovi		
	C3	Met	MMA	MCA	tHCY
Propionska acidemija	↑↑	*N	N	↑↑	N
Metilmalonska acidemija	↑-↑↑	N	↑↑	↑	N
Homocistinurija	N	↑-↑↑	N	N	↑↑
Poremećaju metabolizma kobalamina	↑	↓	↑	N	↑
Manjak metionin adenozil transferaza I/III	N	↑	N	N	↑
Manjak metilentetrahidrofolat reduktaze	N	↓	N	N	↑
Manjak vitamina B12	N	↑	N	N	↑

\*N-normalna koncentracija



**Slika 2.** Princip provođenja drugostupanjskog testa u novorođenačkom probiru (Gramer i Hoffmann, 2022)

Primjena drugostupanjskih testova u NBS-u omogućila je snižavanje graničnih vrijednosti kako bi se smanjio broj lažno negativnih rezultata, a bez većeg povećanja broja lažno pozitivnih (Pajares i sur., 2021). Drugostupanjski testovi najčešće uključuju analizu specifičnih metaboličkih biljeza za neki metabolički poremećaj. Rezultati su pokazali da je C3 najnespecifičniji biljeg, a Hcys je najbolji biljeg druge razine za otkrivanje stečenog nedostatka vitamina B12 (Pajares i sur., 2021)

## 2. Obrazloženje teme

Laboratoriji koji provode novorođenački probir na klasičnu homocistinuriju i manjak vitamina B12 koriste različite postupnike. Unatoč inicijativi da se ujednače kriteriji (Gramer i sur., 2017) to nije jednostavno zbog različite opreme i reagensa koji se koriste, preporučenog vremena uzorkovanja suhih kapi krvi na filtarskom papiru, graničnih vrijednosti kao i izmjerenih parametara temeljem kojih se donose odluke.

Cilj ovog rada je priprema proširenja novorođenačkog probira u Republici Hrvatskoj na navedene bolesti. U tu je svrhu napravljena usporedba šestomjesečnih rezultata mjerenja analita od interesa (C3, C2, Met i Phe) i njihovih međusobnih omjera u novorođenačkom programu Republike Hrvatske s vrijednostima istih analita koji se koriste u postupnicima novorođenačkih programa Austrije, Italije, Njemačke i Španjolske, kako bi se procijenio broj uzorka koji će trebati analizirati drugostupanjskim testovima u našem probiru.

### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Analizirani uzorci isječka DBS-a tandemskom spektrometrijom masa u programu NBS-a RH

Retrospektivo je analizirano 7588 rezultata NBS-a novorođenčadi iz RH u razdoblju od 1.1.2021. do 30.6.2021. godine. Izdvojeni su rezultati terminske novorođenčadi (djeca rođena između 37 i 41 tjedna gestacije i porođajne mase veće od 2500 g) koja nisu bila pozitivna na poremećaje obuhvaćene NBS-om. Odabrana su 24 rodilišta RH s manjim brojem poroda, jer takva rodilišta imaju manji broj prijevremenih poroda.

**Tablica 2.** Popis rodilišta i broja rođenih za razdoblje od 1.1.2021.do 30.6.2021.

	Siječanj	Veljača	Ožujak	Travanj	Svibanj	Lipanj
OB Bjelovar	44	49	48	39	40	45
OB Gospić	22	23	29	17	28	20
OB Dubrovnik	71	65	48	67	65	66
OB Karlovac	62	52	74	64	47	53
OB Knin	22	7	10	13	10	6
OB Koprivnica	74	53	65	43	55	73
OB Metković	3	8	3	7	2	6
OB Našice	38	38	24	35	25	24
OB Nova Gradiška	21	15	25	22	23	28
OB Ogulin	9	13	10	11	9	6
OB Pakrac	44	41	43	38	39	40

OB Požega	34	37	39	25	29	34
OB Pula	115	114	128	115	113	148
OB Sisak	23	43	56	44	53	74
OB Slavonski Brod	89	76	77	72	72	83
OB Šibenik	52	51	50	62	38	44
OB Varaždin	107	105	120	109	107	101
OB Vinkovci	61	44	55	59	53	51
OB Virovitica	60	52	56	42	41	41
OB Vukovar	30	25	36	27	31	34
OB Zabok	85	60	61	79	79	62
OB Zadar	133	115	146	97	100	122
Poliklinika Podobnik	37	34	45	54	53	47
ŽB Čakovec	82	88	107	84	84	78

### 3.2. Metoda korištena za analizu acilkarnitina i aminokiselina iz DBS-a

Za određivanje analita od interesa iz isječka DBS-a korišten je ClinSpot® komercijalni komplet reagensa, namijenjen semikvantitativnom određivanju aminokiselina i acilkarnitina tandemskom spektrometrijom masa. Kontrola kvalitete provedena je pomoću komercijalnih kontrolnih uzoraka DBS-a ClinChek® u dvije koncentracijske razine. Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača i analizirani na HPLC-MS/MS Nexera-MS8050, Shimadzu.

Kemikalije: otopina za ispiranje, mobilna faza, reagens A, reagens B (derivatizirajući reagens), reagens C.



Oprema koja je korištena za provođenje analize: mikrotitarske pločice (96 jažica), zaštitna folija, Eppendorf epruvete, komercijalne ClinChek® kontrole u dva koncentracijska područja, višekanalne pipete, odmjerne tikvice od 25 mL

Instrumenti neophodni za provođenje analize su: uređaj za izrezivanje isječaka uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru (veličine 3,2 mm) PerkinElmer DBS Puncher, mikrocentrifuga Eppendorf, termostabilna mješalica (Termoshaker), sušilo, digester, tandemski spektrometar masa: UPLC Nexera –MS8050 (Shimadzu; Shimadzu)

### 3.2.1. Kratak opis provođenja analize

Priprema uzoraka za analizu aminokiselina i acilkarnitina uključuje ekstrakciju analita iz isječka DBS-a s otopinom metanola koja sadrži interne standarde.

Ekstrakcija analita s internim standardom: pomoću uređaja za izrezivanje isječaka iz uzoraka DBS-a izrezuju se diskovi promjera 3,2 mm i prenose se u jažice na mikrotitarskoj pločici. Svaka pločica sadrži kontrolne uzorke u dva koncentracijska područja u triplikatu, na početku, sredini i kraju pločice. Zatim se u svaku jažicu pipetira 100  $\mu$ L internog standarda; pločica se prekrije zaštitnom folijom te inkubira na mješalici na sobnoj temperaturi i 700 rpm-a tijekom 20 minuta.

Prijenos uzoraka i sušenje: nakon inkubacije potrebno pažljivo ukloniti zaštitnu foliju i prenijeti supernatant u novu mikrotitarsku pločicu (pločica 2), poštivajući pritom redosljed uzoraka iz prve pločice. Pločica se ponovno stavlja na mješalicu, na temperaturu 40°C i 700 rpm-a, te istovremeno uparuje korištenjem sušila do potpunog sušenja. Budući da se isparavanjem reagensa A oslobađaju štetne pare, proces je potrebno provoditi unutar digestora. Nakon uparavanja suha pločica se ostavi u digestoru.

Derivatizacija: kada temperatura na mješalici dosegne 60°C, u svaku se jažicu dodaje 50  $\mu$ L derivatizirajućeg reagensa B te se pločica prekrije zaštitnom folijom. Pločica se zatim inkubira na 60°C tijekom 20 minuta bez miješanja. Nakon inkubacije ponovno slijedi uparavanje do suhoga u digestoru, uz korištenje sušila. Derivatizacijom se aminokiseline prevode u svoje n-butil estere.

Rekonstitucija: Nakon uparivanja, u svaku se jažicu dodaje 100  $\mu$ L reagensa C; pločica se poklopi te inkubira na mješalici tijekom 5 minuta, na sobnoj temperaturi i 700 rpm-a.

Ovisno o osjetljivosti tandemskog spektrometra u LC-MS/MS sustav injektira se 5–10  $\mu$ L supernatanta.

Uzorci pripremljeni na ovaj način stabilni su na sobnoj temperaturi do 7 dana.

Identifikacija pojedinih analita u uzorku omogućena je njihovim karakterističnim masenim prijelazima. Svakoj aminokiselini i acilkarnitinu i pripadajućem internom standardu pridružene su određene očekivane vrijednosti omjera mase i naboja njihovih produktnih i prekursorskih iona. Primjena internog standarda omogućuje semikvantitativno određivanje pojedinih aminokiselina i acilkarnitina. Interni standard sadrži smjesu izotopno-obilježenih aminokiselina i acilkarnitina poznatih koncentracija te se dodaje svakom uzorku u procesu pripreme.

Program korišten za izračunavanje koncentracija aminokiselina i acilkarnitina je NeonatalSolution® povezan s UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu*.

## 4. Rezultati i rasprava

Homocistinurija je dobar kandidat za uvođenje u prošireni NBS. U prilog tome idu dugoročni dokazi o povoljnijem kliničkom ishodu u pacijenata koji su započeli s ranim liječenjem (Gan-Schreier i sur., 2010). Odluka o tome koji nasljedni metabolički poremećaje uključiti u programe NBS-a samo se djelomično temelji na dokazima. Konačni izbor bolesti uvrštene u nacionalni program NBS-a ovisi o političkoj odluci svake države i njezinih institucija i to objašnjava heterogenost programa probira između različitih zemalja. U Europskoj uniji ne postoje usklađene preporuke za uvrštenje u nacionalne programe NBS-a pa je vidljiv jako širok raspon u NBS-u na homocistinuriju.

Provođenje proširenog NBS metodom tandemске spektrometrije masa iz uzorka DBS podrazumijeva analizu aminokiselina i acilkarnitina, kao primarnih biljega, derivatiziranim ili nederivatiziranim metodama. Takvom analizom nisu obuhvaćeni MMA i tHcy, analiti specifični za postavljanje sumnje na homocistinuriju i manjak vitamina B12. Međutim, na potonje poremećaje može se posumnjati i nakon analize primarnih biljega (C3 i omjer C3/C2), ovisno o koncentracijama C3, Met te omjera C3/C2, C3/Met, Met/Phe, C3/C16, C3/C0. Zbog velikog broja lažno pozitivnih rezultata korištenjem samo ovih primarnih biljega neophodno je u postupnik uvrstiti i specifičnije drugostupanjske testove (tHcy, MMA).

Retrospektivnom analizom 7588 uzoraka NBS-a novorođenčadi iz RH za razdoblje od 1.1.2021. do 30.6.2021. određene su granične vrijednosti u zdravoj populaciji za analite: C2, C3, Met, Phe, te njihove omjere C3/C2 i Met/Phe.

**Tablica 3.** Granične vrijednosti koje se najčešće uzimaju u obzir u NBS-u na homocistinuriju i manjak vitamina B12 u zdravoj populaciji RH

	C2 μmol/L	Primarni biljezi		Met μmol/L	Phe μmol/L	Met/Phe
		C3 μmol/L	C3/C2			
Medijan	26.834	2.233	0,083	20.900	49.535	0.419
1th percentile	12.251	0.902	0,041	15.435	31.535	0.251
99th percentila	59.892	5.468	0.179	38.063	83.877	0.738
99.5	65.766	6.005	0.198	42.207	90.027	0.797
99.9	81.209	8.097	0.225	58.344	99.501	0.892
99.99	92.712	10.709	0.326	82.447	108.936	1.213

Statističkom obradom podataka izračunate su mjere centralne tendencije: medijan i percentili ( $P_1$ ,  $P_{99}$ )

Pregledom rezultata probira, za već spomenuto razdoblje u RH izdvojeno je 55 uzoraka čija je koncentracija C3 > 3.2 μmol/L i omjer C3/C2 ≥ 0.20, te 45 uzoraka čija je koncentracija Met < 11 μmol/L i omjer Met/Phe < 0.26. Time su zadovoljeni kriteriji za provedbu drugostupanjskih testova na homocistinuriju i manjak B12 u zemalja koje imaju višegodišnja iskustva u provođenju probira na potonje poremećaje. Od navedenih zemalja za koncentraciju C3 u suhoj kapi krvi najstroži kriterij ima Austrija (C3 > 3.2 μmol/L) (Rozmarić i sur., 2020), a za omjer C3/C2 Italija i Španjolska (C3/C2 > 0.20) (Rossi i sur., 2020; Pajares i sur., 2021).

**Tablica 4.** Uzorci čija je koncentracija C3 > 3.2 μmol/L i omjer C3/C2 ≥ 0.2 zadovoljavaju kriterije prvostupanjskog probira na homocistinuriju i manjak vitamina B12. Podaci su poredani po porođajnoj masi: nedonoščad do 1800 g, od 1800 g do 2500 g, te od 2500 g.

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob / tjedan	Porođajna masa / g	C3 μmol/L	C3/C2	Met μmol/L	Met/Phe	C3/C16	C3/Met	C3/C0	Parenteralna prehrana
1	04.01.2021	M	26	680	11,33	0,21	56,26	0,58	5,47	0,20	0,29	*GUK, AK, Lipidi, Ugroženo dijete, ATB
2	13.02.2021	M	26+2	960	8,05	0,20	59,97	0,56	3,68	0,13	0,14	GUK, AK, Lipidi, Ugroženo dijete, žutica, ATB
3	14/03/2021	Ž	36	1000	3,32	0,20	44,6	0,79	1,94	0,07	0,19	GUK, AK, Lipidi, Ugroženo dijete, žutica, ATB
4	19.05.2021	Ž	27+2	1060	8,50	0,20	119,19	1,08	3,39	0,07	0,23	GUK, AK, Lipidi, Ugroženo dijete
5	03.06.2021	Ž	32	1480	10,38	0,22	54,35	0,48	5,90	0,19	0,29	GUK, AK, Lipidi, Ugroženo dijete, ATB
6	28.03.2021	Ž	30+4	1490	5,80	0,20	20,7	0,58	3,72	0,28	0,17	GUK, AK, Lipidi, ATB

7	19.02.2021	M	38+5	1570	12,32	0,26	42,61	0,61	7,38	0,29	0,31	GUK, AK, Lipidi, Ugroženo dijete, ATB
8	11.01.2021	M	30+6	1671	5,97	0,23	77,4	1,07	3,17	0,08	0,22	/
9	23.04.2021	M	31	1750	11,37	0,28	37,64	0,78	5,05	0,30	0,18	/
10	28.05.2021	Ž	33+1	1788	6,95	0,31	31,5	0,80	7,29	0,22	0,12	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete, ATB
11	19.05.2021	M	32+5	1790	8,09	0,21	32,4	0,56	2,40	0,25	0,17	GUK,AK, Lipidi, žutica, ATB
12	04.06.2021	Ž	32+2	1860	6,60	0,20	38	0,42	1,52	0,17	0,15	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete, žutica, ATB
13	04.01.2021	M	33+1	1871	8,17	0,25	56,9	0,79	3,29	0,14	0,28	GUK, AK, Lipidi, ATB
14	04.02.2021	Ž	40+6	2030	6,72	0,32	15,5	0,29	1,95	0,43	0,21	/

15	14.06.2021	M	33+4	2055	7,12	0,26	32,1	0,45	1,84	0,22	0,14	GUK,AK, Ugroženo dijete, žutica, ATB
16	28.01.2021	M	34	2090	5,89	0,20	51,5	0,67	1,77	0,11	0,17	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete, žutica
17	12.02.2021	Ž	32	2200	5,86	0,21	42,5	0,61	2,00	0,14	0,16	GUK,AK, Ugroženo dijete, ATB
18	09.01.2021	Ž	/	2242	8,07	0,20	26	0,37	2,01	0,31	0,13	/
19	21.01.2021	M	/	2250	6,15	0,25	23	0,40	1,49	0,27	0,23	/
20	31.01.2021	Ž	34	2300	6,21	0,29	58	0,72	2,56	0,11	0,29	GUK, AK, Lipidi, ATB
21	08.06.2021	Ž	38	2320	5,68	0,24	45,88	0,47	1,56	0,12	0,19	GUK, AK, Lipidi
22	05.01.2021	Ž	34	2340	9,60	0,38	24,4	0,38	2,18	0,39	0,31	GUK, AK, Ugroženo dijete, Žutica, ATB
23	28.03.2021	M	34	2350	7,56	0,20	70,63	0,78	1,90	0,11	0,11	GUK,AK, Ugroženo dijete

24	08.02.2021	M	35	2400	6,72	0,22	53,9	0,58	1,39	0,12	0,20	GUK, AK, Ugroženo dijete, Žutica, ATB
25	04.01.2021	M	33+5	2420	6,59	0,25	37,4	0,47	2,21	0,18	0,35	GUK, AK, Lipidi, ATB
26	19.04.2021	Ž	35	2450	7,02	0,24	45,7	0,56	1,95	0,15	0,24	GUK, AK, Lipidi
27	03.04.2021	M	33	2506	5,81	0,24	28,7	0,53	1,85	0,20	0,20	GUK,AK, Ugroženo dijete, žutica, ATB
28	22.02.2021	M	35+3	2580	5,75	0,21	36,5	0,44	1,34	0,16	0,25	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete, ATB
29	05.05.2021	Ž	35	2615	8,88	0,22	47,01	0,53	3,03	0,19	0,22	GUK,AK, Lipidi, žutica
30	02.04.2021	M	/	2620	6,26	0,22	56,5	0,74	2,26	0,11	0,19	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete
31	04.02.2021	Ž	39	2700	6,87	0,21	51	0,55	1,10	0,13	0,21	GUK,AK, Ugroženo dijete
32	18.05.2021	Ž	37	2700	7,21	0,22	77,1	0,86	3,19	0,09	0,26	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete, ATB



33	12.03.2021	M	33+2	2720	5,61	0,22	45,9	0,59	1,48	0,12	0,20	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete, žutica, ATB
34	18.04.2021	Ž	36	2740	5,98	0,20	23,8	0,32	2,26	0,25	0,14	/
35	19.02.2021	M	38+2	2750	5,98	0,20	16,5	0,30	0,96	0,36	0,15	/
36	04.06.2021	M	33+5	2760	7,12	0,20	50,4	0,52	2,26	0,14	0,20	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete, žutica, ATB
37	01.04.2021	M	/	2790	5,86	0,40	46,7	0,68	4,89	0,13	0,25	/
38	12.03.2021	M	36+5	2850	7,28	0,25	43,6	0,73	0,12	0,17	0,28	GUK,AK, Lipidi, Ugroženo dijete
39	23.03.2021	Ž	36	2920	6,44	0,21	17,9	0,34	2,27	0,36	0,15	Žutica
40	17.03.2021	Ž	37	3010	5,94	0,21	27,5	1,00	1,53	0,22	0,19	/
41	15/03/2021	Ž	38	3120	3,33	0,20	17,4	0,52	1,05	0,19	0,16	/

42	05.02.2021	M	/	3240	6,12	0,21	22,67	0,43	0,95	0,27	0,22	/
43	15.03.2021	Ž	38	3280	6,44	0,20	27,4	0,62	1,66	0,23	0,21	/
44	09.03.2021	Ž	40	3450	7,95	0,21	18,27	0,31	1,13	0,44	0,12	/
45	11/03/2021	M	38+6	3460	3,36	0,20	45,1	0,69	1,14	0,07	0,18	GUK, ATB
46	30.04.2021	M	/	3550	5,95	0,22	23,3	0,47	2,22	0,26	0,24	/
47	11.02.2021	M	39+4	3630	5,60	0,21	19,4	0,40	1,60	0,29	0,19	/
48	10.04.2021	M	40	3760	6,95	0,24	55,1	0,60	1,81	0,13	0,27	GUK,AK, Ugroženo dijete, ATB
49	18.02.2021	Ž	39+4	3860	6,01	0,28	25,2	0,40	1,31	0,24	0,29	/
50	11.06.2021	Ž	39	3980	5,81	0,26	24,9	0,44	1,45	0,23	0,22	/
51	16.02.2021	Ž	39	4100	5,75	0,21	26	0,58	1,18	0,22	0,19	GUK, ATB

52	19.03.2021	Ž	39	4320	7,18	0,21	23,9	0,46	1,54	0,30	0,23	/
53	22.02.2021	M	38+1	4520	5,54	0,21	27,9	0,47	1,63	0,20	0,20	/
54	20.01.2021	Ž	40	4700	5,77	0,21	16,6	0,42	1,18	0,35	0,15	/
55	03/05/2021	M	40	/	3,41	0,20	14,1	0,32	1,13	0,24	0,18	/

\*GUK-glukoza, AK-aminokiseline, ATB-antibiotik

**Tablica 5.** Uzorci čija je koncentracija Met < 11 μmol/L i omjer Met/Phe < 0.26 zadovoljavaju kriterije prvostupanjskog probira na homocistinuriju i manjak vitamina B12. Podaci su poredani po porođajnoj masi: nedonoščad do 1800 g, od 1800 g do 2500 g, te od 2500 g.

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/tjedni	Porođajna masa/g	Met<11 μmol/L	Met/Phe<0.26
1	25.01.2021	M	31+3	1.300,00	10,50	0,25
2	11.03.2021	Ž	32+5	1.450,00	6,60	0,36
3	26.01.2021	M	36+4	1.633,00	9,10	0,40
4	10.03.2021	Ž	35	1.690,00	10,30	0,20
5	11.05.2021	M	35+2	1.840,00	9,30	0,19
6	30.05.2021	Ž	34	1.950,00	10,60	0,34
7	22.04.2021	M	32+4	2.220,00	9,80	0,20
8	06.01.2021	M	36+5	2.230,00	10,00	0,25
9	14.05.2021	Ž	38+1	2.460,00	10,70	0,25
10	23.06.2021	Ž	40	2.600,00	9,80	0,24
11	02.02.2021	Ž	38+5	2.680,00	10,40	0,26
12	06.04.2021	Ž	40	2.760,00	10,50	0,15
13	01.01.2021	Ž	39	2.800,00	9,00	0,21
14	23.06.2021	Ž	40	2.860,00	9,00	0,15

15	24.06.2021	M	37+4	2.880,00	10,00	0,31
16	05.02.2021	M	39+2	2.940,00	10,10	0,25
17	27.04.2021	M	40	2.950,00	10,40	0,19
18	02.04.2021	M	38+5	2.960,00	10,40	0,23
19	07.06.2021	M	41	3.060,00	10,60	0,23
20	20.06.2021	Ž	40	3.060,00	10,60	0,31
21	10.03.2021	Ž	40	3.140,00	10,60	0,27
22	27.01.2021	M	37+3	3.190,00	10,50	0,31
23	01.03.2021	M	40	3.200,00	10,20	0,32
24	12.05.2021	M	41	3.250,00	10,30	0,22
25	21.02.2021	M	/	3.250,00	10,70	0,29
26	04.02.2021	M	39	3.300,00	10,00	0,17
27	20.06.2021	M	40+5	3.420,00	10,30	0,23
28	08.01.2021	M	38	3.420,00	10,30	0,32
29	13.02.2021	M	39	3.480,00	9,90	0,24
30	30.01.2021	M	40+5	3.510,00	10,00	0,24

31	08.02.2021	M	40+5	3.510,00	10,60	0,33
32	04.03.2021	M	39+3	3.520,00	10,90	0,24
33	25.02.2021	Ž	40	3.540,00	8,30	0,20
34	08.02.2021	M	39	3.550,00	10,40	0,26
35	12.01.2021	Ž	41	3.550,00	10,20	0,27
36	09.02.2021	Ž	38+1	3.560,00	10,90	0,31
37	15.03.2021	Ž	40	3.570,00	7,30	0,19
38	04.01.2021	M	41	3.590,00	9,80	0,28
39	15.01.2021	M	/	3.600,00	10,90	0,27
40	09.03.2021	M	41	3.630,00	8,70	0,23
41	09.02.2021	M	40+6	3.730,00	9,60	0,26
42	11.01.2021	Ž	40+2	3.740,00	9,40	0,29
43	20.04.2021	M	40	3.770,00	10,60	0,29
44	16.02.2021	M	40	3.780,00	9,10	0,27
45	16.03.2021	M	41	3.850,00	9,50	0,17

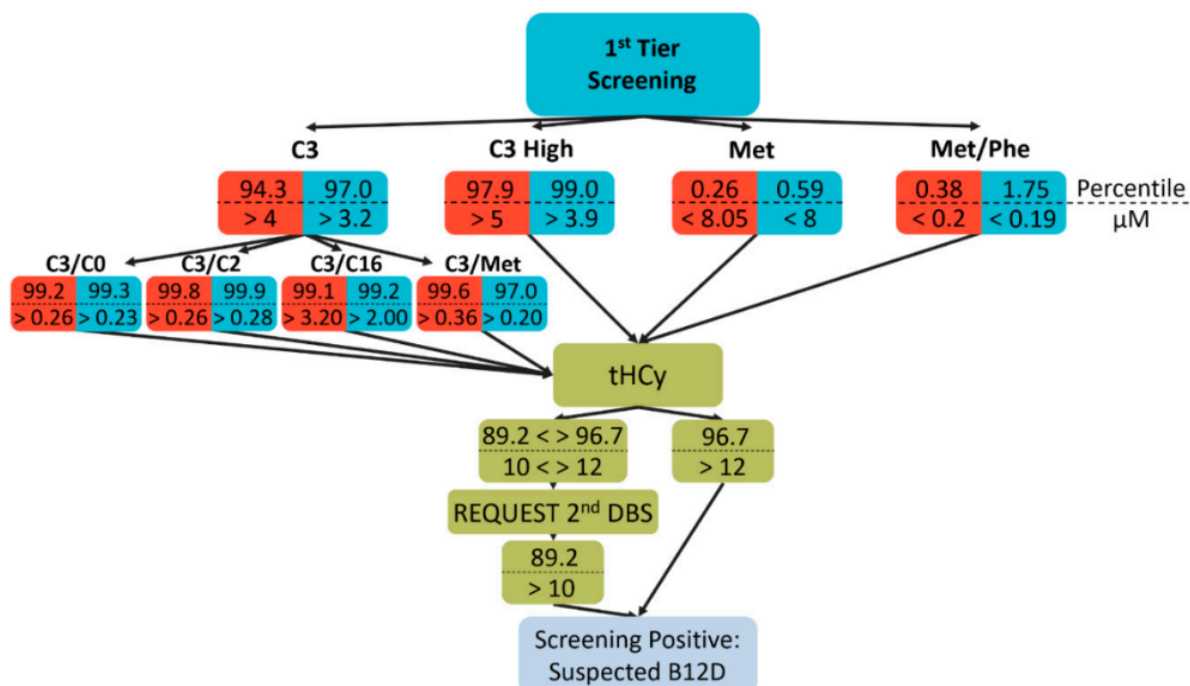
Izdvojeni su rezultati probira terminske djece jer se u dosadašnjim studijama pokazalo:

Spol je povezan samo s omjerom C3/C2 (otprilike 0.003 veći kod žena). Porođajna težina i gestacijska dob su u negativnoj korelaciji s koncentracijom Met i omjerom Met/Phe (npr. smanjenje od približno 0.02 za Met/Phe od najveće gestacijske dobi ili težine do najniže gestacijske dobi ili težine). Nadalje, potvrđena je pozitivna korelacija između porođajne težine i gestacijske dobi s koncentracijom C3 i omjerom C3/C2 (npr. C3/C2 se povećava za približno 0.08 odnosno 0.09 od najviše gestacijske dobi ili težine do najniže gestacijske dobi ili težine) (Keller i sur., 2019.)

55 uzoraka (za jedan uzorak nije dostupna informacija o porođajnoj težini) razvrstano je u tablici br. 4 i 45 uzoraka razvrstano je tablici br. 5 po tjelesnoj težini do 1800 g, od 1800 g do 2500 g i od 2500 g. Nedonoščad ima različite referentne intervale od terminske novorođenčadi, a o tome ovisi tumačenje izmjerenih vrijednosti biljega. Za nedonoščad s porođajnom masom manjom od 1800 grama i/ili gestacijskom dobi manjom od 32 tjedna uzorak je potrebno uzimati tri puta, obavezno je potrebno obilježiti koja je to kartica po redu (Bilandžija i sur., 2018): između 48 i 72 sata starosti, drugu s dva tjedna starosti, treću s četiri tjedna starosti djeteta. Kada novorođenče prima potpunu parenteralnu prehranu čak i male količine parenteralne prehrane mogu poništiti neke rezultate probira za acilkarnitine i aminokiseline.

#### 4.1. Postupnik austrijskog NBS programa na manjak B12 vitamina

U postupniku za NBS koji se koristi u Republici Austriji za isključivanje manjka vitamina B12 primarno se oslanjaju na izmjerene koncentracije C3 i Met te omjere C3/C0, C3/C2, C3/C16, C3/Met, Met/Phe. Kao drugostupanjski test mjeri se tHcy iz istog uzorka DBS. Tijekom vremena u postupniku su se promijenile granične vrijednosti analita obzirom na promjenu metode (slika br.3). Za usporedbu s vrijednostima biljega novorođenčadi RH korištene su granične vrijednosti iz prvog (crvenog) razdoblja. Crveno su označene granične vrijednosti izmjerene **derivatiziranim metodom**, a plavom bojom granične vrijednosti dobivene nederivatiziranim metodom kompleta reagensa tvrtke Recipe.



**Slika 3.** Postupnik novorođenačkog probirana na nedostatak vitamina B12 (Rozmarić i sur., 2020)

U sve novorođenačadi s koncentracijom C3 >5.0 µmol/L mjeri se ukupni Hcy (tHCy). U novorođenačadi s C3 >4.0 µmol/L odluka o mjerenju tHCy ovisi o povećanju barem jednog od sljedećih omjera: C3/C0, C3/C2, C3/C16 i C3/Met. Isto tako, Met <8.05 µmol/L ili omjer Met/Phe <0.20 uključuje daljnje mjerenje tHCy (Rozmarić i sur., 2020). Kod novorođenačadi se sumnjalo na manjak vit. B12 ako su vrijednosti tHCy bile preko 12 µmol/L. Mjerenje tHCy uvijek je ponovljeno u iz drugog uzorka DBS-a ako je primarna vrijednost bila između 10 µmol/L i 12 µmol/L. Ako je mjerenje iz drugog uzorka DBS bilo iznad 10 µmol/L proglašen je pozitivan probir. Primjenom navedenog postupnika za NBS u Austriji bi pozitivno bilo 75 djece godišnje (85 000 rođenih na godinu) s mogućim rizikom razvoja svih simptoma koji prate manjak vitamina B12. Ovako visoka prevalencija manjka vitamina B12 ukazuje na veliku potrebu boljeg informiranja javnosti o nužnoj suplementaciji vitaminom B12 žena tijekom trudnoće i dojenja.

Kada postupnik temeljen na C3 i C3/C2 za prvostupanjski i drugostupanjski test Austrije primijenimo na 55 novorođenačadi u RH, njih 51 bi bilo pozitivno na prvostupanjskom testu i postojala bi potreba za drugostupanjskim testom.



**Tablica 6.** Broj pozitivnih novorođenčadi nakon prvostupanjskog probira korištenjem Austrijskog postupnika;  $C3 > 5.0 \mu\text{mol/L}$  ili  $C3 > 4.0 \mu\text{mol/L}$ ,  $C3/C2 > 0.26$ ,  $C3/C16 > 3.2$ ,  $C3/\text{Met} > 0.36$ ,  $C3/C0 > 0.26$ .

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/ tjedni	Porodajna masa/ g	$C3 > 5.0$ ili $C3 > 4.0$ $\mu\text{mol/L}$	$C3/C2 > 0.26$	$C3/C16 > 3.20$	$C3/\text{Met} > 0.36$	$C3/C0 > 0.26$
1	04.01.2021	M	26	680	11,33	0,21	5,47	0,20	0,29
2	13.02.2021	M	26+2	960	8,05	0,20	3,68	0,13	0,14
3	14/03/2021	Ž	36	1000	3,32	0,20	1,94	0,07	0,19
4	19.05.2021	Ž	27+2	1060	8,50	0,20	3,39	0,07	0,23
5	03.06.2021	Ž	32	1480	10,38	0,22	5,90	0,19	0,29
6	28.03.2021	Ž	30+4	1490	5,80	0,20	3,72	0,28	0,17
7	19.02.2021	M	38+5	1570	12,32	0,26	7,38	0,29	0,31
8	11.01.2021	M	30+6	1671	5,97	0,23	3,17	0,08	0,22

9	23.04.2021	M	31	1750	11,37	0,28	5,05	0,30	0,18
10	28.05.2021	Ž	33+1	1788	6,95	0,31	7,29	0,22	0,12
11	19.05.2021	M	32+5	1790	8,09	0,21	2,40	0,25	0,17
12	04.06.2021	Ž	32+2	1860	6,60	0,20	1,52	0,17	0,15
13	04.01.2021	M	33+1	1871	8,17	0,25	3,29	0,14	0,28
14	04.02.2021	Ž	40+6	2030	6,72	0,32	1,95	0,43	0,21
15	14.06.2021	M	33+4	2055	7,12	0,26	1,84	0,22	0,14
16	28.01.2021	M	34	2090	5,89	0,20	1,77	0,11	0,17
17	12.02.2021	Ž	32	2200	5,86	0,21	2,00	0,14	0,16
18	09.01.2021	Ž	/	2242	8,07	0,20	2,01	0,31	0,13

19	21.01.2021	M	/	2250	6,15	0,25	1,49	0,27	0,23
20	31.01.2021	Ž	34	2300	6,21	0,29	2,56	0,11	0,29
21	08.06.2021	Ž	38	2320	5,68	0,24	1,56	0,12	0,19
22	05.01.2021	Ž	34	2340	9,60	0,38	2,18	0,39	0,31
23	28.03.2021	M	34	2350	7,56	0,20	1,90	0,11	0,11
24	08.02.2021	M	35	2400	6,72	0,22	1,39	0,12	0,20
25	04.01.2021	M	33+5	2420	6,59	0,25	2,21	0,18	0,35
26	19.04.2021	Ž	35	2450	7,02	0,24	1,95	0,15	0,24
27	03.04.2021	M	33	2506	5,81	0,24	1,85	0,20	0,20
28	22.02.2021	M	35+3	2580	5,75	0,21	1,34	0,16	0,25

29	05.05.2021	Ž	35	2615	8,88	0,22	3,03	0,19	0,22
30	02.04.2021	M	/	2620	6,26	0,22	2,26	0,11	0,19
31	04.02.2021	Ž	39	2700	6,87	0,21	1,10	0,13	0,21
32	18.05.2021	Ž	37	2700	7,21	0,22	3,19	0,09	0,26
33	12.03.2021	M	33+2	2720	5,61	0,22	1,48	0,12	0,20
34	18.04.2021	Ž	36	2740	5,98	0,20	2,26	0,25	0,14
35	19.02.2021	M	38+2	2750	5,98	0,20	0,96	0,36	0,15
36	04.06.2021	M	33+5	2760	7,12	0,20	2,26	0,14	0,20
37	01.04.2021	M	/	2790	5,86	0,40	4,89	0,13	0,25
38	12.03.2021	M	36+5	2850	7,28	0,25	0,12	0,17	0,28

39	23.03.2021	Ž	36	2920	6,44	0,21	2,27	0,36	0,15
40	17.03.2021	Ž	37	3010	5,94	0,21	1,53	0,22	0,19
41	15/03/2021	Ž	38	3120	3,33	0,20	1,05	0,19	0,16
42	05.02.2021	M	/	3240	6,12	0,21	0,95	0,27	0,22
43	15.03.2021	Ž	38	3280	6,44	0,20	1,66	0,23	0,21
44	09.03.2021	Ž	40	3450	7,95	0,21	1,13	0,44	0,12
45	11/03/2021	M	38+6	3460	3,36	0,20	1,14	0,07	0,18
46	30.04.2021	M	/	3550	5,95	0,22	2,22	0,26	0,24
47	11.02.2021	M	39+4	3630	5,60	0,21	1,60	0,29	0,19
48	10.04.2021	M	40	3760	6,95	0,24	1,81	0,13	0,27

49	18.02.2021	Ž	39+4	3860	6,01	0,28	1,31	0,24	0,29
50	11.06.2021	Ž	39	3980	5,81	0,26	1,45	0,23	0,22
51	16.02.2021	Ž	39	4100	5,75	0,21	1,18	0,22	0,19
52	19.03.2021	Ž	39	4320	7,18	0,21	1,54	0,30	0,23
53	22.02.2021	M	38+1	4520	5,54	0,21	1,63	0,20	0,20
54	20.01.2021	Ž	40	4700	5,77	0,21	1,18	0,35	0,15
55	03/05/2021	M	40	/	3,41	0,20	1,13	0,24	0,18

Ako bi koristili potonji postupnik, u 51 DBS-u u razdoblju od šest mjeseci bi trebali mjeriti tHcy, odnosno oko 2 DBS-a tjedno.

Kada postupnik temeljen na Met i Met/Phe za prvostupanjski i drugostupanjski test Austrije primijenimo na 45 novorođenčadi u RH, njih 25 bi bilo pozitivno na prvostupanjskom testu i postojala bi potreba za drugostupanjskim testom.

**Tablica 7.** Broj pozitivnih novorođenčadi nakon prvostupanjskog probira korištenjem Austrijskog postupnika; Met < 8.05  $\mu\text{mol/L}$  i Met/Phe < 0.20

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/ tjedni	Porodajna masa/ g	Met<8.05 $\mu\text{mol/L}$	Met/Phe<0.20
1	25.01.2021	M	31+3	1.300,00	10,50	0,25
2	11.03.2021	Ž	32+5	1.450,00	6,60	0,36
3	26.01.2021	M	36+4	1.633,00	9,10	0,40
4	10.03.2021	Ž	35	1.690,00	10,30	0,20
5	11.05.2021	M	35+2	1.840,00	9,30	0,19
6	30.05.2021	Ž	34	1.950,00	10,60	0,34
7	22.04.2021	M	32+4	2.220,00	9,80	0,20
8	06.01.2021	M	36+5	2.230,00	10,00	0,25
9	14.05.2021	Ž	38+1	2.460,00	10,70	0,25
10	23.06.2021	Ž	40	2.600,00	9,80	0,24
11	02.02.2021	Ž	38+5	2.680,00	10,40	0,26
12	06.04.2021	Ž	40	2.760,00	10,50	0,15
13	01.01.2021	Ž	39	2.800,00	9,00	0,21
14	23.06.2021	Ž	40	2.860,00	9,00	0,15

15	24.06.2021	M	37+4	2.880,00	10,00	0,31
16	05.02.2021	M	39+2	2.940,00	10,10	0,25
17	27.04.2021	M	40	2.950,00	10,40	0,19
18	02.04.2021	M	38+5	2.960,00	10,40	0,23
19	07.06.2021	M	41	3.060,00	10,60	0,23
20	20.06.2021	Ž	40	3.060,00	10,60	0,31
21	10.03.2021	Ž	40	3.140,00	10,60	0,27
22	27.01.2021	M	37+3	3.190,00	10,50	0,31
23	01.03.2021	M	40	3.200,00	10,20	0,32
24	12.05.2021	M	41	3.250,00	10,30	0,22
25	21.02.2021	M	/	3.250,00	10,70	0,29
26	04.02.2021	M	39	3.300,00	10,00	0,17
27	20.06.2021	M	40+5	3.420,00	10,30	0,23
28	08.01.2021	M	38	3.420,00	10,30	0,32
29	13.02.2021	M	39	3.480,00	9,90	0,24
30	30.01.2021	M	40+5	3.510,00	10,00	0,24

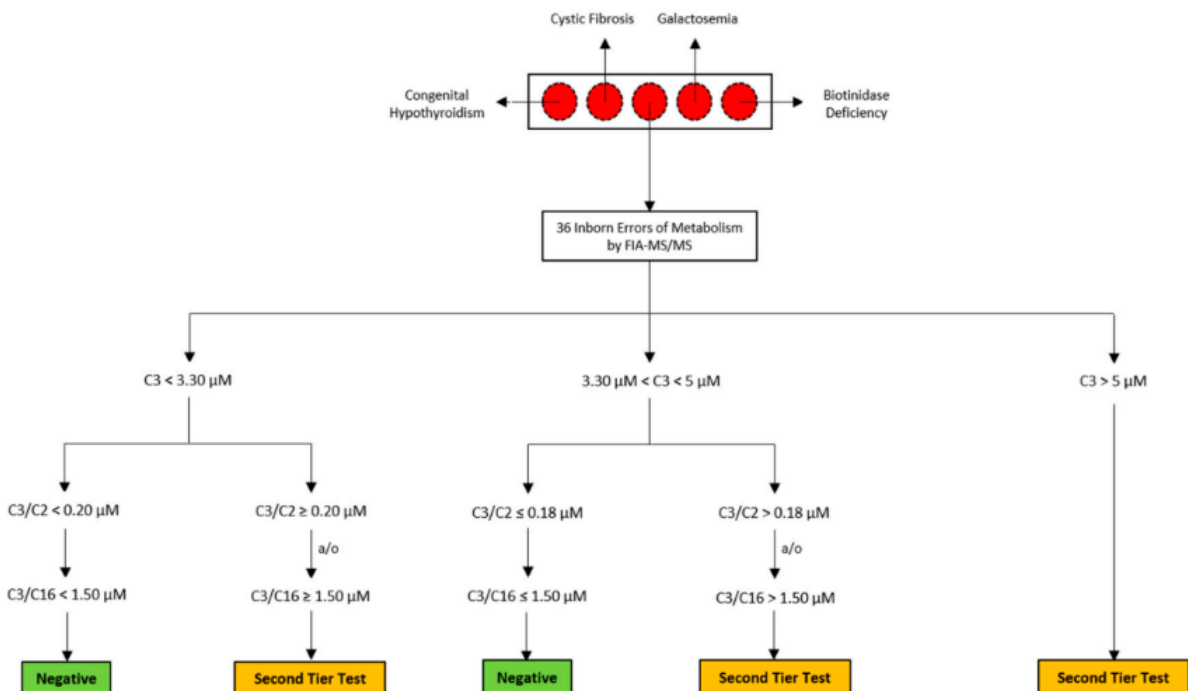


31	08.02.2021	M	40+5	3.510,00	10,60	0,33
32	04.03.2021	M	39+3	3.520,00	10,90	0,24
33	25.02.2021	Ž	40	3.540,00	8,30	0,20
34	08.02.2021	M	39	3.550,00	10,40	0,26
35	12.01.2021	Ž	41	3.550,00	10,20	0,27
36	09.02.2021	Ž	38+1	3.560,00	10,90	0,31
37	15.03.2021	Ž	40	3.570,00	7,30	0,19
38	04.01.2021	M	41	3.590,00	9,80	0,28
39	15.01.2021	M	/	3.600,00	10,90	0,27
40	09.03.2021	M	41	3.630,00	8,70	0,23
41	09.02.2021	M	40+6	3.730,00	9,60	0,26
42	11.01.2021	Ž	40+2	3.740,00	9,40	0,29
43	20.04.2021	M	40	3.770,00	10,60	0,29
44	16.02.2021	M	40	3.780,00	9,10	0,27
45	16.03.2021	M	41	3.850,00	9,50	0,17

Ako bi koristili potonji postupnik, u 25 DBS-a u razdoblju od šest mjeseci bi trebali mjeriti tHcy, odnosno oko 1 DBS tjedno.

## 4.2. Postupnik talijanskog NBS programa nakon povišene koncentracije C3

Kako bi se poboljšala interpretacija rezultata NBS-a u Italiji, često se, uz apsolutne razine C3, procjenjuje i omjer C3/C2 te C3/C16. Svi metaboliti i omjeri praćeni tijekom testa probira prve razine, ako su promijenjeni, i dalje zahtijevaju test druge razine za potvrdu dijagnostičke sumnje (Rossi i sur., 2020).



**Slika 4.** Postupnik za ispitivanja druge razine s izmjenjenim C3 (Rossi i sur., 2020).

Uzorci za drugostupanjski test odabrani su prema tri moguće kombinacije biljega:

- ako je koncentracija  $C3 < 3.30 \mu\text{mol/L}$ , a omjer  $C3/C2 \geq 0.20$  i/ili  $C3/C16 \geq 1.50$
- ako je koncentracija  $C3 \rightarrow 3.30 \mu\text{mol/L} < C3 < 5 \mu\text{mol/L}$ , a omjer  $C3/C2 > 0.18$  i/ili  $C3/C16 > 1.5$
- ako je koncentracija  $C3 > 5 \mu\text{mol/L}$

Kod rezultata s izmijenjenim vrijednostima primarnih biljega potrebno je provesti drugostupanjski test za određivanje koncentracija Hcy, MMA i MCA kako bi se dodatno istražila dijagnostička sumnja. Izmijenjene vrijednosti primarnih biljega u proširenom NBS-u

moгу biti uzrokovane utjecajem genoma ili vanjskih čimbenika, ali također na umu treba imati majčin utjecaj npr. manjak vitamina B12 zbog malnutricije u trudnoći (Rossi i sur., 2020).

Kada postupnik za prvostupanjski test Italije primijenimo na 55 novorođenčadi u RH svih 55 novorođenčadi bilo bi pozitivno na prvostupanjskom testu i postojala bi potreba za drugostupanjskim testom.

**Tablica 8.** Broj pozitivnih novorođenčadi nakon prvostupanjskog probira korištenjem Talijanskog postupnika.

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/ tjedni	Porođajna masa/ g	C3 > 5 ili 3.30 < C3 < 5 μmol/L	C3/C2 > 0.18	C3/C16 > 1.50
1	04.01.2021	M	26	680	11,33	0,21	5,47
2	13.02.2021	M	26+2	960	8,05	0,2	3,68
3	14.03.2021	Ž	36	1000	3,32	0,2	1,94
4	19.05.2021	Ž	27+2	1060	8,5	0,2	3,39
5	03.06.2021	Ž	32	1480	10,38	0,22	5,9
6	28.03.2021	Ž	30+4	1490	5,8	0,2	3,72
7	19.02.2021	M	38+5	1570	12,32	0,26	7,38
8	11.01.2021	M	30+6	1671	5,97	0,23	3,17
9	23.04.2021	M	31	1750	11,37	0,28	5,05
10	28.05.2021	Ž	33+1	1788	6,95	0,31	7,29
11	19.05.2021	M	32+5	1790	8,09	0,21	2,4

12	04.06.2021	Ž	32+2	1860	6,6	0,2	1,52
13	04.01.2021	M	33+1	1871	8,17	0,25	3,29
14	04.02.2021	Ž	40+6	2030	6,72	0,32	1,95
15	14.06.2021	M	33+4	2055	7,12	0,26	1,84
16	28.01.2021	M	34	2090	5,89	0,2	1,77
17	12.02.2021	Ž	32	2200	5,86	0,21	2
18	09.01.2021	Ž	/	2242	8,07	0,2	2,01
19	21.01.2021	M	/	2250	6,15	0,25	1,49
20	31.01.2021	Ž	34	2300	6,21	0,29	2,56
21	08.06.2021	Ž	38	2320	5,68	0,24	1,56
22	05.01.2021	Ž	34	2340	9,6	0,38	2,18
23	28.03.2021	M	34	2350	7,56	0,2	1,9
24	08.02.2021	M	35	2400	6,72	0,22	1,39
25	04.01.2021	M	33+5	2420	6,59	0,25	2,21
26	19.04.2021	Ž	35	2450	7,02	0,24	1,95
27	03.04.2021	M	33	2506	5,81	0,24	1,85

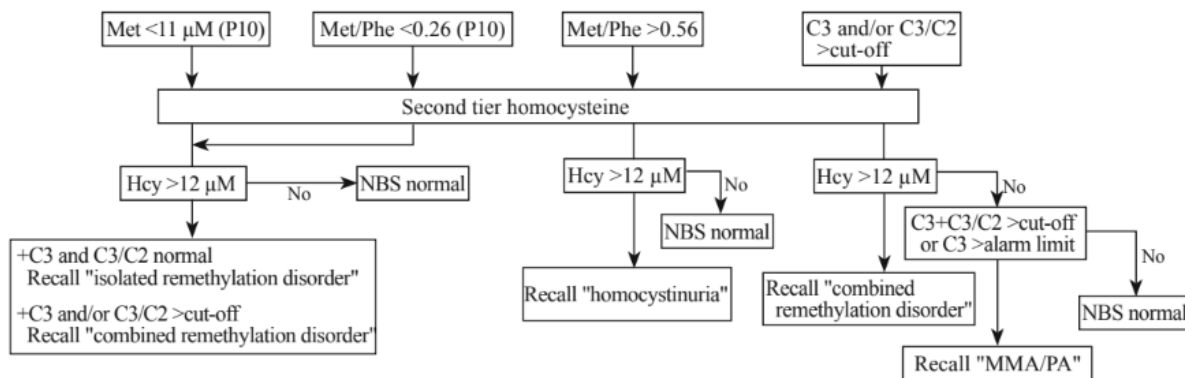
28	22.02.2021	M	35+3	2580	5,75	0,21	1,34
29	05.05.2021	Ž	35	2615	8,88	0,22	3,03
30	02.04.2021	M	/	2620	6,26	0,22	2,26
31	04.02.2021	Ž	39	2700	6,87	0,21	1,1
32	18.05.2021	Ž	37	2700	7,21	0,22	3,19
33	12.03.2021	M	33+2	2720	5,61	0,22	1,48
34	18.04.2021	Ž	36	2740	5,98	0,2	2,26
35	19.02.2021	M	38+2	2750	5,98	0,2	0,96
36	04.06.2021	M	33+5	2760	7,12	0,2	2,26
37	01.04.2021	M	/	2790	5,86	0,4	4,89
38	12.03.2021	M	36+5	2850	7,28	0,25	0,12
39	23.03.2021	Ž	36	2920	6,44	0,21	2,27
40	17.03.2021	Ž	37	3010	5,94	0,21	1,53
41	15.03.2021	Ž	38	3120	3,33	0,2	1,05
42	05.02.2021	M	/	3240	6,12	0,21	0,95
43	15.03.2021	Ž	38	3280	6,44	0,2	1,66

44	09.03.2021	Ž	40	3450	7,95	0,21	1,13
45	11.03.2021	M	38+6	3460	3,36	0,2	1,14
46	30.04.2021	M	/	3550	5,95	0,22	2,22
47	11.02.2021	M	39+4	3630	5,6	0,21	1,6
48	10.04.2021	M	40	3760	6,95	0,24	1,81
49	18.02.2021	Ž	39+4	3860	6,01	0,28	1,31
50	11.06.2021	Ž	39	3980	5,81	0,26	1,45
51	16.02.2021	Ž	39	4100	5,75	0,21	1,18
52	19.03.2021	Ž	39	4320	7,18	0,21	1,54
53	22.02.2021	M	38+1	4520	5,54	0,21	1,63
54	20.01.2021	Ž	40	4700	5,77	0,21	1,18
55	03.05.2021	M	40	/	3,41	0,2	1,13

Ako bi koristili potonji postupnik, u 55 DBS-a u razdoblju od šest mjeseci bi trebali mjeriti tHcy, odnosno oko 2 DBS-a tjedno.

### 4.3. Kriteriji za drugostupanjski test mjerenja Hcy u njemačkom NBS-u

Prilagođena strategija NBS-a razvijena je za Njemačku mjerenjem koncentracije Met, omjera Met/Phe, koncentracije C3 i omjera C3/C2 s predloženim graničnim vrijednostima u prvostupanjskom testu i mjerenjem koncentracije Hcy kao druge razine ako barem jedan od parametara prve razine bude bio izvan raspona. Retrospektivna procjena 12 uzoraka probira novorođenčadi s poremećajima remetilacije ili nedostatkom vitamina B12 pokazala je da bi svi ti pacijenti bili otkriveni korištenjem graničnih vrijednosti predloženih u novoj strategiji (Gramer i sur., 2017). Snižavanjem graničnih vrijednosti za Met i Met/Phe s 10. percentila na 1. percentil (Met: 8  $\mu\text{mol/L}$ , Met/Phe: 0,18) i dalje bi jasno otkrio 2 od 3 bolesnika s izoliranim poremećajima remetilacije. Predloženo je da se zadrže granične vrijednosti prve razine za Met i Met/Phe u prospektivnoj studiji za Njemačku (Gramer i sur., 2017).



**Slika 5.** Predloženi novi postupnik za NBS u Njemačkoj (Gramer i sur., 2017)

Ukoliko je koncentracija Met < 11  $\mu\text{mol/L}$ , omjer Met/Phe < 0.26 ili Met/Phe > 0.56, koncentracija C3 > 5.5  $\mu\text{mol/L}$ , a omjer C3/C2 > 0.22, C3/C0 > 0.28 (Gramer i sur., 2017) tada se provodi drugostupanjski test i mjerenje koncentracije tHcy. Ako je koncentracija tHcy < 12  $\mu\text{mol/L}$  probir se smatra normalnim, a ako je tHcy > 12  $\mu\text{mol/L}$  onda prema postupniku slijede dodatni izračuni omjera izmjerenih analita koji usmjeravaju prema mogućim poremećajima: klasične Hcy, MMA/PA, poremećajima remetilacije.

Ako bi potonji postupnik primijenili na rezultate NBS novorođenčadi u RH, za njih 53 bi bilo pozitivno na prvostupanjskom testu na manjak vitamina B12 i postojala bi potreba za drugostupanjskim testom.

**Tablica 9.** Broj pozitivnih novorođenčadi nakon prvostupanjskog probira na manjak vitamina B12 korištenjem Njemačkog postupnika

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/ tjedni	Porodajna masa/ g	C3 >5.5 μmol/L	C3/C2 >0,22	C3/C0 >0.28	Met <11 μmol/L	Met/Phe >0.56
1	04.01.2021	M	26	680	11,33	0,21	0,29	56,26	0,58
2	13.02.2021	M	26+2	960	8,05	0,2	0,14	59,97	0,56
3	14.03.2021	Ž	36	1000	3,32	0,2	0,19	44,6	0,79
4	19.05.2021	Ž	27+2	1060	8,5	0,2	0,23	119,19	1,08
5	03.06.2021	Ž	32	1480	10,38	0,22	0,29	54,35	0,48
6	28.03.2021	Ž	30+4	1490	5,8	0,2	0,17	20,7	0,58
7	19.02.2021	M	38+5	1570	12,32	0,26	0,31	42,61	0,61
8	11.01.2021	M	30+6	1671	5,97	0,23	0,22	77,4	1,07
9	23.04.2021	M	31	1750	11,37	0,28	0,18	37,64	0,78
10	28.05.2021	Ž	33+1	1788	6,95	0,31	0,12	31,5	0,8
11	19.05.2021	M	32+5	1790	8,09	0,21	0,17	32,4	0,56
12	04.06.2021	Ž	32+2	1860	6,6	0,2	0,15	38	0,42
13	04.01.2021	M	33+1	1871	8,17	0,25	0,28	56,9	0,79
14	04.02.2021	Ž	40+6	2030	6,72	0,32	0,21	15,5	0,29



15	14.06.2021	M	33+4	2055	7,12	0,26	0,14	32,1	0,45
16	28.01.2021	M	34	2090	5,89	0,2	0,17	51,5	0,67
17	12.02.2021	Ž	32	2200	5,86	0,21	0,16	42,5	0,61
18	09.01.2021	Ž	/	2242	8,07	0,2	0,13	26	0,37
19	21.01.2021	M	/	2250	6,15	0,25	0,23	23	0,4
20	31.01.2021	Ž	34	2300	6,21	0,29	0,29	58	0,72
21	08.06.2021	Ž	38	2320	5,68	0,24	0,19	45,88	0,47
22	05.01.2021	Ž	34	2340	9,6	0,38	0,31	24,4	0,38
23	28.03.2021	M	34	2350	7,56	0,2	0,11	70,63	0,78
24	08.02.2021	M	35	2400	6,72	0,22	0,20	53,9	0,58
25	04.01.2021	M	33+5	2420	6,59	0,25	0,35	37,4	0,47
26	19.04.2021	Ž	35	2450	7,02	0,24	0,24	45,7	0,56
27	03.04.2021	M	33	2506	5,81	0,24	0,20	28,7	0,53
28	22.02.2021	M	35+3	2580	5,75	0,21	0,25	36,5	0,44
29	05.05.2021	Ž	35	2615	8,88	0,22	0,22	47,01	0,53
30	02.04.2021	M	/	2620	6,26	0,22	0,19	56,5	0,74

31	04.02.2021	Ž	39	2700	6,87	0,21	0,21	51	0,55
32	18.05.2021	Ž	37	2700	7,21	0,22	0,26	77,1	0,86
33	12.03.2021	M	33+2	2720	5,61	0,22	0,20	45,9	0,59
34	18.04.2021	Ž	36	2740	5,98	0,2	0,14	23,8	0,32
35	19.02.2021	M	38+2	2750	5,98	0,2	0,15	16,5	0,3
36	04.06.2021	M	33+5	2760	7,12	0,2	0,20	50,4	0,52
37	01.04.2021	M	/	2790	5,86	0,4	0,25	46,7	0,68
38	12.03.2021	M	36+5	2850	7,28	0,25	0,28	43,6	0,73
39	23.03.2021	Ž	36	2920	6,44	0,21	0,15	17,9	0,34
40	17.03.2021	Ž	37	3010	5,94	0,21	0,19	27,5	1
41	15.03.2021	Ž	38	3120	3,33	0,2	0,16	17,4	0,52
42	05.02.2021	M	/	3240	6,12	0,21	0,22	22,67	0,43
43	15.03.2021	Ž	38	3280	6,44	0,2	0,21	27,4	0,62
44	09.03.2021	Ž	40	3450	7,95	0,21	0,12	18,27	0,31
45	11.03.2021	M	38+6	3460	3,36	0,2	0,18	45,1	0,69
46	30.04.2021	M	/	3550	5,95	0,22	0,24	23,3	0,47

47	11.02.2021	M	39+4	3630	5,6	0,21	0,19	19,4	0,4
48	10.04.2021	M	40	3760	6,95	0,24	0,27	55,1	0,6
49	18.02.2021	Ž	39+4	3860	6,01	0,28	0,29	25,2	0,4
50	11.06.2021	Ž	39	3980	5,81	0,26	0,22	24,9	0,44
51	16.02.2021	Ž	39	4100	5,75	0,21	0,19	26	0,58
52	19.03.2021	Ž	39	4320	7,18	0,21	0,23	23,9	0,46
53	22.02.2021	M	38+1	4520	5,54	0,21	0,20	27,9	0,47
54	20.01.2021	Ž	40	4700	5,77	0,21	0,15	16,6	0,42
55	03.05.2021	M	40	/	3,41	0,2	0,18	14,1	0,32

Ako bi koristili potonji postupnik, u 53 DBS-a u razdoblju od šest mjeseci bi trebali mjeriti tHcy, odnosno oko 2 DBS-a tjedno.

Ako bi navedeni postupnik primijenili na 45 rezultata NBS-a novorođenčadi u RH, svih 45 bi bilo pozitivno na prvostupanjskom testu na poremećaje remetilacije i postojala bi potreba za drugostupanjskim testom.

**Tablica 10.** Broj pozitivnih novorođenčadi nakon prvostupanjskog probira na poremećaje remetilacije korištenjem Njemačkog postupnika

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/tjedni	Porodajna masa/g	Met<11μmol/L	Met/Phe >0.26
1	25.01.2021	M	31+3	1.300,00	10,50	0,25
2	11.03.2021	Ž	32+5	1.450,00	6,60	0,36
3	26.01.2021	M	36+4	1.633,00	9,10	0,40
4	10.03.2021	Ž	35	1.690,00	10,30	0,20
5	11.05.2021	M	35+2	1.840,00	9,30	0,19
6	30.05.2021	Ž	34	1.950,00	10,60	0,34
7	22.04.2021	M	32+4	2.220,00	9,80	0,20
8	06.01.2021	M	36+5	2.230,00	10,00	0,25
9	14.05.2021	Ž	38+1	2.460,00	10,70	0,25
10	23.06.2021	Ž	40	2.600,00	9,80	0,24
11	02.02.2021	Ž	38+5	2.680,00	10,40	0,26
12	06.04.2021	Ž	40	2.760,00	10,50	0,15
13	01.01.2021	Ž	39	2.800,00	9,00	0,21
14	23.06.2021	Ž	40	2.860,00	9,00	0,15

15	24.06.2021	M	37+4	2.880,00	10,00	0,31
16	05.02.2021	M	39+2	2.940,00	10,10	0,25
17	27.04.2021	M	40	2.950,00	10,40	0,19
18	02.04.2021	M	38+5	2.960,00	10,40	0,23
19	07.06.2021	M	41	3.060,00	10,60	0,23
20	20.06.2021	Ž	40	3.060,00	10,60	0,31
21	10.03.2021	Ž	40	3.140,00	10,60	0,27
22	27.01.2021	M	37+3	3.190,00	10,50	0,31
23	01.03.2021	M	40	3.200,00	10,20	0,32
24	12.05.2021	M	41	3.250,00	10,30	0,22
25	21.02.2021	M	/	3.250,00	10,70	0,29
26	04.02.2021	M	39	3.300,00	10,00	0,17
27	20.06.2021	M	40+5	3.420,00	10,30	0,23
28	08.01.2021	M	38	3.420,00	10,30	0,32
29	13.02.2021	M	39	3.480,00	9,90	0,24
30	30.01.2021	M	40+5	3.510,00	10,00	0,24

31	08.02.2021	M	40+5	3.510,00	10,60	0,33
32	04.03.2021	M	39+3	3.520,00	10,90	0,24
33	25.02.2021	Ž	40	3.540,00	8,30	0,20
34	08.02.2021	M	39	3.550,00	10,40	0,26
35	12.01.2021	Ž	41	3.550,00	10,20	0,27
36	09.02.2021	Ž	38+1	3.560,00	10,90	0,31
37	15.03.2021	Ž	40	3.570,00	7,30	0,19
38	04.01.2021	M	41	3.590,00	9,80	0,28
39	15.01.2021	M	/	3.600,00	10,90	0,27
40	09.03.2021	M	41	3.630,00	8,70	0,23
41	09.02.2021	M	40+6	3.730,00	9,60	0,26
42	11.01.2021	Ž	40+2	3.740,00	9,40	0,29
43	20.04.2021	M	40	3.770,00	10,60	0,29
44	16.02.2021	M	40	3.780,00	9,10	0,27
45	16.03.2021	M	41	3.850,00	9,50	0,17

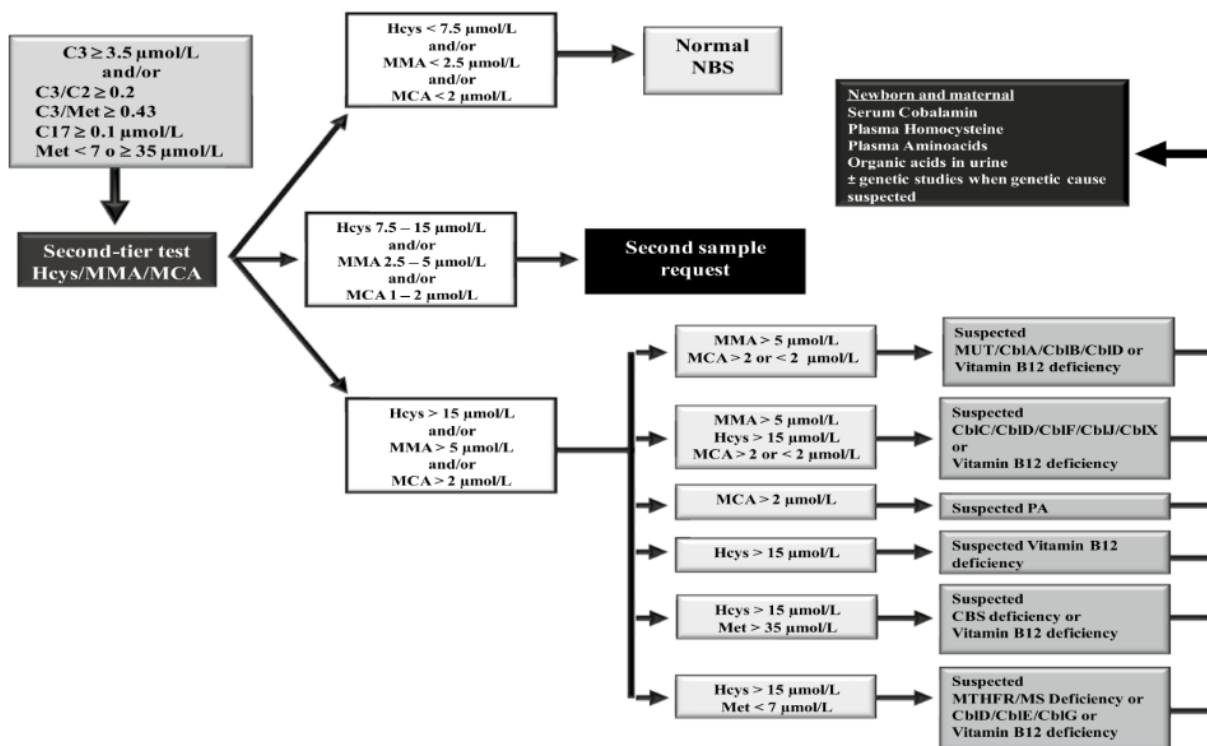
Ako bi koristili postupnik koji se koristi u Njemačkoj, u 45 DBS-a u razdoblju od šest mjeseci bi trebali mjeriti tHcy, odnosno oko 2 uzorka DBS-a tjedno.

#### 4.4. Drugostupanjski test španjolskog programa probira novorođenčadi na manjak vitamina B12

Španjolska 2015. uvodi drugostupanjsko testiranje u NBS najviše s razlogom otkrivanja stečenog i urođenog manjka vitamina B12. Primarnim probirom se mjeri koncentracija C3, omjer C3/C2, C3/Met, koncentracija heptadekanoil karnitina (C17) i Met. Kada se bilo koji od primarnih biljega promijeni, uzorci se podvrgavaju testu druge razine na istom DBS-u, koji uključuje istovremeno mjerenje MMA, MCA i Hcys.

NBS se klasificira kao normalan kada su svi biljezi ispod granične vrijednosti; kao sumnjiv, kada jedan ili više biljega pokazuje srednje vrijednosti i kao promijenjen kada je bilo koji od biljega jasno iznad odgovarajućih graničnih razina. U dvojbjenim slučajevima zahtijeva se drugi DBS i ponovno se izvodi mjerenje prvostupanjskih i drugostupanjskih biljega (Pajares i sur., 20221).

Za daljnju klasifikaciju bolesti provode se laboratorijski testovi u urinu (MMA, MCA), plazmi (ukupni Hcys, MMA, acilkarnitini i aminokiseline) i serumu (vitamin B12). Isti su testovi provedeni i na majkama, a folat je rutinski mjeren prilikom mjerenja vitamina B12 u majki.



**Slika 6.** Postupnik za NBS na remetilacijske poremećaje i stečeni manjak vitamina B12 u Španjolskoj (Pajares i sur., 2021).

Granična vrijednost koncentracije C3 spuštena je s 4.5  $\mu\text{mol/L}$  na 3.5  $\mu\text{mol/L}$ . Time je smanjena vjerojatnost lažno negativnih te povećan broj lažno pozitivnih zbog čega su i uveli probir druge razine. Kada je bilo koji od primarnih biljega povišen, uzorci se podvrgavaju probiru druge razine na istim DBS-ovima. Simultano se mjere MMA, MCA i Hcys. Ako je koncentracija uzorku  $C3 \geq 3.5 \mu\text{mol/L}$  i/ili omjer  $C3/C2 \geq 0.2$ , omjer  $C3/Met \geq 0.43$ , koncentracija  $C17 \geq 0.1 \mu\text{mol/L}$ , a koncentracija  $Met < 7 \mu\text{mol/L}$  ili  $Met \geq 35 \mu\text{mol/L}$  tada se uzorak podvrgava probiru druge razine i prema dobivenim rezultatima svrstava u tri kategorije: normalan, sumnjiv (dvojbeni), promijenjen.

Kada postupnik temeljen na C3 i C3/C2 za prvostupanjski i drugostupanjski test Španjolske primijenimo na 55 novorođenčadi u RH, svih 55 bi bilo pozitivno na prvostupanjskom testu i postojala bi potreba za drugostupanjskim testom.



**Tablica 11.** Broj pozitivnih novorođenčadi nakon prvostupanjskog probira korištenjem Španjolskog postupnika;  $C3 \geq 3.5 \mu\text{mol/L}$ ,  $C3/C2 \geq 0.20$ ,  $\text{Met} \geq 35 \mu\text{mol/L}$ ,  $C3/\text{Met} \geq 0.43$

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/tjedni	Porodajna masa/ g	$C3 \geq 3.5 \mu\text{mol/L}$	$C3/C2 \geq 0.20$	$\text{Met} \geq 35 \mu\text{mol/L}$	$C3/\text{Met} \geq 0.43$
1	04.01.2021	M	26	680	11,33	0,21	56,26	0,20
2	13.02.2021	M	26+2	960	8,05	0,2	59,97	0,13
3	14.03.2021	Ž	36	1000	3,32	0,2	44,6	0,07
4	19.05.2021	Ž	27+2	1060	8,5	0,2	119,19	0,07
5	03.06.2021	Ž	32	1480	10,38	0,22	54,35	0,19
6	28.03.2021	Ž	30+4	1490	5,8	0,2	20,7	0,28
7	19.02.2021	M	38+5	1570	12,32	0,26	42,61	0,29
8	11.01.2021	M	30+6	1671	5,97	0,23	77,4	0,08
9	23.04.2021	M	31	1750	11,37	0,28	37,64	0,30
10	28.05.2021	Ž	33+1	1788	6,95	0,31	31,5	0,22
11	19.05.2021	M	32+5	1790	8,09	0,21	32,4	0,25
12	04.06.2021	Ž	32+2	1860	6,6	0,2	38	0,17
13	04.01.2021	M	33+1	1871	8,17	0,25	56,9	0,14
14	04.02.2021	Ž	40+6	2030	6,72	0,32	15,5	0,43

15	14.06.2021	M	33+4	2055	7,12	0,26	32,1	0,22
16	28.01.2021	M	34	2090	5,89	0,2	51,5	0,11
17	12.02.2021	Ž	32	2200	5,86	0,21	42,5	0,14
18	09.01.2021	Ž	/	2242	8,07	0,2	26	0,31
19	21.01.2021	M	/	2250	6,15	0,25	23	0,27
20	31.01.2021	Ž	34	2300	6,21	0,29	58	0,11
21	08.06.2021	Ž	38	2320	5,68	0,24	45,88	0,12
22	05.01.2021	Ž	34	2340	9,6	0,38	24,4	0,39
23	28.03.2021	M	34	2350	7,56	0,2	70,63	0,11
24	08.02.2021	M	35	2400	6,72	0,22	53,9	0,12
25	04.01.2021	M	33+5	2420	6,59	0,25	37,4	0,18
26	19.04.2021	Ž	35	2450	7,02	0,24	45,7	0,15
27	03.04.2021	M	33	2506	5,81	0,24	28,7	0,20
28	22.02.2021	M	35+3	2580	5,75	0,21	36,5	0,16
29	05.05.2021	Ž	35	2615	8,88	0,22	47,01	0,19
30	02.04.2021	M	/	2620	6,26	0,22	56,5	0,11

31	18.05.2021	Ž	37	2700	7,21	0,22	77,1	0,09
32	04.02.2021	Ž	39	2700	6,87	0,21	51	0,13
33	12.03.2021	M	33+2	2720	5,61	0,22	45,9	0,12
34	18.04.2021	Ž	36	2740	5,98	0,2	23,8	0,25
35	19.02.2021	M	38+2	2750	5,98	0,2	16,5	0,36
36	04.06.2021	M	33+5	2760	7,12	0,2	50,4	0,14
37	01.04.2021	M	/	2790	5,86	0,4	46,7	0,13
38	12.03.2021	M	36+5	2850	7,28	0,25	43,6	0,17
39	23.03.2021	Ž	36	2920	6,44	0,21	17,9	0,36
40	17.03.2021	Ž	37	3010	5,94	0,21	27,5	0,22
41	15.03.2021	Ž	38	3120	3,33	0,2	17,4	0,19
42	05.02.2021	M	/	3240	6,12	0,21	22,67	0,27
43	15.03.2021	Ž	38	3280	6,44	0,2	27,4	0,23
44	09.03.2021	Ž	40	3450	7,95	0,21	18,27	0,44
45	11.03.2021	M	38+6	3460	3,36	0,2	45,1	0,07
46	30.04.2021	M	/	3550	5,95	0,22	23,3	0,26

47	11.02.2021	M	39+4	3630	5,6	0,21	19,4	0,29
48	10.04.2021	M	40	3760	6,95	0,24	55,1	0,13
49	18.02.2021	Ž	39+4	3860	6,01	0,28	25,2	0,24
50	11.06.2021	Ž	39	3980	5,81	0,26	24,9	0,23
51	16.02.2021	Ž	39	4100	5,75	0,21	26	0,22
52	19.03.2021	Ž	39	4320	7,18	0,21	23,9	0,30
53	22.02.2021	M	38+1	4520	5,54	0,21	27,9	0,20
54	20.01.2021	Ž	40	4700	5,77	0,21	16,6	0,35
55	03.05.2021	M	40	/	3,41	0,2	14,1	0,24

Ako bi koristili postupnik koji se koristi u Španjolskoj , u 55 DBS-a u razdoblju od šest mjeseci bi trebali mjeriti tHcy, odnosno oko 2 uzorka DBS-a tjedno.

Kada postupnik temeljen na Met < 7  $\mu\text{mol/L}$  za prvostupanjski i drugostupanjski test Španjolske primijenimo na 45 novorođenčadi u RH, samo 1 bi bilo pozitivno na prvostupanjskom testu i postojala bi potreba za drugostupanjskim testom.

**Tablica 12.** Broj pozitivnih novorođenčadi nakon prvostupanjskog probira korištenjem Španjolskog postupnika; Met < 7  $\mu\text{mol/L}$

Redni broj	Datum rođenja	Spol	Gestacijska dob/ tjedni	Porodajna masa/ g	Met <7 $\mu\text{mol/L}$
1	25.01.2021	M	31+3	1.300,00	10,50
2	11.03.2021	Ž	32+5	1.450,00	<b>6,60</b>
3	26.01.2021	M	36+4	1.633,00	9,10
4	10.03.2021	Ž	35	1.690,00	10,30
5	11.05.2021	M	35+2	1.840,00	9,30
6	30.05.2021	Ž	34	1.950,00	10,60
7	22.04.2021	M	32+4	2.220,00	9,80
8	06.01.2021	M	36+5	2.230,00	10,00
9	14.05.2021	Ž	38+1	2.460,00	10,70
10	23.06.2021	Ž	40	2.600,00	9,80
11	02.02.2021	Ž	38+5	2.680,00	10,40
12	06.04.2021	Ž	40	2.760,00	10,50
13	01.01.2021	Ž	39	2.800,00	9,00
14	23.06.2021	Ž	40	2.860,00	9,00

15	24.06.2021	M	37+4	2.880,00	10,00
16	05.02.2021	M	39+2	2.940,00	10,10
17	27.04.2021	M	40	2.950,00	10,40
18	02.04.2021	M	38+5	2.960,00	10,40
19	07.06.2021	M	41	3.060,00	10,60
20	20.06.2021	Ž	40	3.060,00	10,60
21	10.03.2021	Ž	40	3.140,00	10,60
22	27.01.2021	M	37+3	3.190,00	10,50
23	01.03.2021	M	40	3.200,00	10,20
24	12.05.2021	M	41	3.250,00	10,30
25	21.02.2021	M	/	3.250,00	10,70
26	04.02.2021	M	39	3.300,00	10,00
27	20.06.2021	M	40+5	3.420,00	10,30
28	08.01.2021	M	38	3.420,00	10,30
29	13.02.2021	M	39	3.480,00	9,90
30	30.01.2021	M	40+5	3.510,00	10,00

31	08.02.2021	M	40+5	3.510,00	10,60
32	04.03.2021	M	39+3	3.520,00	10,90
33	25.02.2021	Ž	40	3.540,00	8,30
34	12.01.2021	Ž	41	3.550,00	10,20
35	08.02.2021	M	39	3.550,00	10,40
36	09.02.2021	Ž	38+1	3.560,00	10,90
37	15.03.2021	Ž	40	3.570,00	7,30
38	04.01.2021	M	41	3.590,00	9,80
39	15.01.2021	M	/	3.600,00	10,90
40	09.03.2021	M	41	3.630,00	8,70
41	09.02.2021	M	40+6	3.730,00	9,60
42	11.01.2021	Ž	40+2	3.740,00	9,40
43	20.04.2021	M	40	3.770,00	10,60
44	16.02.2021	M	40	3.780,00	9,10
45	16.03.2021	M	41	3.850,00	9,50

Ako bi koristili postupnik koji se koristi u Španjolskoj morali bi izmjeriti tHcy u DBS-u samo jednom uzorku u razdoblju od 6 mjeseci.

## 5. Zaključci

- Postupnici za provođenje NBS-a na homocistinuriju i manjak vitamina B12 se razlikuju i među zemljama u Europi, ovisno o izboru analita kao i njihovim graničnim vrijednostima.
- Svi postupnici NBS-a kao prvostupanjski test uključuju koncentraciju  $C3 > 3.2$   $\mu\text{mol/L}$  i omjer  $C3/C2 \geq 0.20$ , te koncentraciju  $\text{Met} < 11$   $\mu\text{mol/L}$  i omjer  $\text{Met/Phe} < 0.26$ . U postupnicima se prije drugostupanjskih testova mogu koristiti izmjerene vrijednosti i drugih analita, odnosno njihovih omjera:  $C3/\text{Met}$ ,  $C3/C0$ ,  $C3/C16$ ,  $C17$ . U probiru na homocistinuriju i manjak vitamina B12 kao drugostupanjski test u svim postupnicima se koristi mjerenje tHy iz istog uzorka DBS.
- Primjenom kriterija iz postupnika Austrije, Italije, Njemačke i Španjolske na rezultate NBS RH u razdoblju od 1.1.2021. do 30.6.2021. godine, procijenjeno je da bi se za dva uzorka tjedno trebao provoditi drugostupanjski test mjerenja Hcy. Broj uzoraka za mjerenje Hcy u drugostupanjskom testu je prihvatljiv za provođenje NBS na homocistinuriju i manjak vitamina B12 u RH.
- Prije uvođenja nove bolesti u nacionalni program novorođenačkog probira neophodno je napisati elaborat opravdanosti, provedivosti i održivosti, koji treba sadržavati i prijedlog postupnika.



## 6. Popis kratica, oznaka i simbola

SSIEM- Društvo za proučavanje nasljednih metaboličkih bolesti

IMD- Nasljedne metaboličke bolesti

NBS-Novorođenački probir

RH- Republika Hrvatska

KBC- Klinički bolnički centar

EMA- Europska agencija za lijekove

cbIG- Manjak metionin sintaze

cbIE- Manjak metionin sintaza reduktaze

CBS- cistation  $\beta$ -sintaza

MTHFR- 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze

DNK- Deoksiribonukleinska kiselina

MTHF- Metilentetrahidrofolat

THF- Tetrahidrofolat

C3- Propionil karnitin

MMA- Metilmalonska kiselina

MCA- Metil citratna kiselina

Hcy- Homocistein

tHcy- Ukupni homocistein

C2- Acetilkarnitin

C0- Slobodni karnitin

C16- Palmitoilkarnitin

C17- Heptadekanoil-karnitin

OB- Opća bolnica

## 7. Literatura

Alodaib AN, Carpenter K, Wiley V, Wotton T, Christodoulou J, Wilcken B. Homocysteine measurement in dried blood spot for neonatal detection of homocystinurias. *JIMD Rep.* 2012, 5, 1-6.

Bilandžija I, Barić I, Škaričić A, Zekušić M, Križić I, Petković Ramadža D, Žigman T, Fumić K. Program proširenog novorođenačkog probira u Republici Hrvatskoj – zahtjevi i izazovi pravilnog uzimanja suhe kapi krvi. *Paediatrica Croatica. Supplement*, 2018, 62(1), 10-14.

Burlina A, Jones SA, Chakrapani A, Church HJ, Heales S, Wu THY, Morton G, Roberts P, Sluys EF, Cheillan D. A New Approach to Objectively Evaluate Inherited Metabolic Diseases for Inclusion on Newborn Screening Programmes. *Int J Neonatal Screen*, 2022, 8(2), 25.

Dobrow MJ, Hagens V, Chafe R, Sullivan T, Rabeneck L. Consolidated principles for screening based on a systematic review and consensus process. *CMAJ*, 2018, 190(14), E422-E429.

Gan-Schreier H, Kebbewar M, Fang-Hoffmann J, et al. Newborn population screening for classic homocystinuria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. *J Pediatr.* 2010, 156, 427-432.

Gelb MH, Basheeruddin K, Burlina A, Chen HJ, Chien YH, Dizikes G, Dorley C, Giugliani R, Hietala A, Hong X, Kao SM, Khaledi H, Klug T, Kubaski F, Liao HC, Martin M, Manning A, Orsini J, Peng Y, Ranieri E, Rohrwasser A, Szabo-Fresnais N, Turgeon CT, Vaz FM, Wang LY, Matern D. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening Laboratories. *Int J Neonatal Screen.* 2022, 8(4), 62.

Gramer G, Abdoh G, Ben-Omran T, Shahbeck N, Ali R, Mahmoud L, Fang-Hoffmann J, Hoffmann GF, Al Rifai H, Okun JG. Newborn screening for remethylation disorders and vitamin B12 deficiency-evaluation of new strategies in cohorts from Qatar and Germany. *World J Pediatr.* 2017, 13(2), 136-143.

Gramer G, Hoffmann GF. Vitamin B12 Deficiency in Newborns and their Mothers-Novel Approaches to Early Detection, Treatment and Prevention of a Global Health Issue. *Curr Med Sci.* 2020, 40(5), 801-809.

- Gramer G, Hoffmann GF. Second-tier strategies in newborn screening – potential and limitation. *Medizinische Genetik*. 2022, 34(1), 21-28.
- Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin Biochem Rev*. 2011, 32(1), 5-31.
- Green R, Allen LH, Bjørke-Monsen AL, Brito A, Guéant JL, Miller JW, Molloy AM, Nexø E, Stabler S, Toh BH, Ueland PM, Yajnik C. Vitamin B12 deficiency. *Nat Rev Dis Primers*. 2017, 3:17040.
- Hannibal L, Lysne V, Bjørke-Monsen AL, Behringer S, Grünert SC, Spiekerkoetter U, Jacobsen DW, Blom HJ. Biomarkers and Algorithms for the Diagnosis of Vitamin B12 Deficiency. *Front Mol Biosci*. 2016, 3(27).
- Holub M, Tuschl K, Ratschmann R et al. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 373(1-2), 27-31.
- Homocysteine (Total), Methylmalonic Acid, and Methylcitric Acid, Blood Spot, <https://www.mayocliniclabs.com/>, pristupljeno 10.7.2023
- Homocystinuria, 2023., <https://medlineplus.gov/> , pristupljeno 25.6.2023.
- Informacije za javnost o novorođenačkom probiru, 2023., <https://www.kbc-zagreb.hr/>, pristupljeno 1.5.2023.
- Informacije za javnost o novorođenačkom probiru, 2023., [www.hzjz.hr](http://www.hzjz.hr) , pristupljeno 1.5.2023.
- Jones SA, Cheillan D, Chakrapani A, Church HJ, Heales S, Wu THY, Morton G, Roberts P, Sluys EF, Burlina A. Application of a Novel Algorithm for Expanding Newborn Screening for Inherited Metabolic Disorders across Europe. *Int J Neonatal Screen*, 2022, 8(1), 20.
- Keller R i sur. Newborn screening for homocystinuria: Recent recommendations versus current practice. *J Inherit Metab Dis*. 2019, 42(1), 128-139.
- Kumar T, Sharma GS, Singh LR. Homocystinuria: Therapeutic approach. *Clinica Chimica Acta*, 2016, 458, 55-62.
- Mandour I, El Gayar D, Amin M, et al. Amino acid and acylcarnitine profiles in premature neonates: a pilot study. *Indian J Pediatr* 2013, 80, 736–44.

McHugh D. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project. *Genet Med*, 2011, 13(3), 230-54.

Ministarstvo zdravlja Republike Hrvatske, Nacionalni program za rijetke bolesti 2015.-2020., 2015.

Orphan designation: Overview, <https://www.ema.europa.eu/en>, pristupljeno 29.4.2023.

O bolestima-Hrvatski savez za rijetke bolesti, <https://rijetke-bolesti.com/>, pristupljeno 29.4.2023.

Pajares S, Arranz JA, Ormazabal A. *et al.* Implementation of second-tier tests in newborn screening for the detection of vitamin B12 related acquired and genetic disorders: results on 258,637 newborns. *Orphanet J Rare Dis*. 2021, 16, 195.

Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009, 30(1), 19-34.

Reischl-Hajiabadi AT, Garbade SF, Feyh P, Weiss KH, Mütze U, Kölker S, Hoffmann GF, Gramer G. Maternal Vitamin B12 Deficiency Detected by Newborn Screening-Evaluation of Causes and Characteristics. *Nutrients*. 2022, 14(18), 3767.

Richter T, Nestler-Parr S, Babela R, Khan ZM, Tesoro T, Molsen E, Hughes DA. Rare Disease Terminology and Definitions—A Systematic Global Review: Report of the ISPOR Rare Disease Special Interest Group. *Value in Health*, 2015, 18(6), 906-914.

Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Saunders, 6th edition, 2017.

Rossi C, Cicalini I, Rizzo C, Zucchelli M, Consalvo A, Valentinuzzi S, Semeraro D, Gasparroni G, Brindisino P, Gazzolo D, Dionisi-Vici C, De Laurenzi V, Pieragostino D. A False-Positive Case of Methylmalonic Aciduria by Tandem Mass Spectrometry Newborn Screening Dependent on Maternal Malnutrition in Pregnancy. *Int J Environ Res Public Health*. 2020, 17(10), 3601.

Rozmarič T, Mitulović G, Konstantopoulou V, Goeschl B, Huemer M, Plecko B, Spenger J, Wortmann SB, Scholl-Bürgi S, Karall D, Greber-Platzer S, Zeyda M. Elevated Homocysteine after Elevated Propionylcarnitine or Low Methionine in Newborn Screening Is Highly

Predictive for Low Vitamin B12 and Holo-Transcobalamin Levels in Newborns. *Diagnostics* (Basel). 2020, 10(9), 626.

Scolamiero E, Villani GR, Ingenito L, Pecce R, Albano L, Caterino M, di Girolamo MG, Di Stefano C, Franzese I, Gallo G, Ruoppolo M. Maternal vitamin B12 deficiency detected in expanded newborn screening. *Clin Biochem*. 2014, 47(18), 312-7.

Stabler SP. Vitamin B12 deficiency. *N Engl J Med*. 2013, 368(21), 2041-2.

Tarini BA, Clark SJ and Pilli S. False-positive newborn screening result and future health care use in a state Medicaid cohort. *Pediatrics* 2011, 128, 715–722.

Wilson JM., Jungner YG. Principles and practice of mass screening for disease. U: Principles. Bull. WHO. 1968, 14-39.

Yue X, Liu W, Liu Y, Shen M, Zhai Y, Ma Z, Cao Z. Development, validation, and clinical application of an FIA-MS/MS method for the quantification of lysophosphatidylcholines in dried blood spots. *J Clin Lab Anal*. 2022, 36, 24099.

## 8. Sažetak/Summary

### 8.1. Sažetak

Rijetke bolesti imaju nisku prevalenciju u populaciji, javljaju se u manje od pet pojedinaca na 10 000 osoba i većinom se kasno dijagnosticiraju. Nasljedne metaboličke bolesti su rijetke bolesti koje nastaju kao posljedica smanjene aktivnosti enzima, prijenosnika ili kofaktora. NBS je postupak kojim se organizirano i sustavno otkrivaju urođene bolesti u novorođenačkoj populaciji sa svrhom njihovog pravovremenog prepoznavanja. NBS je u RH započeo 1978., a danas se izvodi probira na devet nasljednih metaboličkih bolesti. Testovi probira nisu dijagnostički testovi, oni upućuju na novorođenčad koja bi mogla imati određeni metabolički poremećaj i isključuju one koji te poremećaje vjerojatno nemaju. Laboratoriji koji provode NBS na klasičnu homocistinuriju i manjak vitamina B12 koriste različite postupnike. Provođenje proširenog NBS-a metodom LC-MS/MS iz uzorka DBS-a podrazumijeva analizu aminokiselina i acilkarnitina, kao primarnih biljega, derivatiziranim ili nederivatiziranim metodama. Zbog velikog broja lažno pozitivnih rezultata nakon analize primarnih biljega C3, C2, Met i Phe na homocistinuriju i manjak vitamina B12, neophodno je u postupnik uvrstiti i specifičnije drugostupanjske testove (tHcy, MMA). Cilj ovog rada je priprema proširenja novorođenačkog probira u RH na navedene bolesti. U tu je svrhu napravljena usporedba šestomjesečnih rezultata mjerenja analita od interesa (C3, C2, Met i Phe) i njihovih međusobnih omjera u NBS-u RH s vrijednostima istih analita koji se koriste u postupnicima novorođenačkih programa Austrije, Italije, Njemačke i Španjolske. Procijenjeno je da bi primjenom kriterija iz postupnika navedenih zemalja na rezultate NBS RH, za šestomjesečno razdoblje, broj uzoraka za mjerenje Hcy u drugostupanjskom testu bio prihvatljiv za provođenje NBS-a na homocistinuriju i manjak vitamina B12 u RH.

## 8.2. Summary

Rare diseases have a low prevalence in the population, they occur in less than five individuals per 10,000 people and are mostly diagnosed late. Inherited metabolic diseases are rare diseases that occur as a result of reduced activity of enzymes, transporters or cofactors. NBS is a procedure for the organized and systematic detection of congenital diseases in the newborn population with the purpose of their timely recognition. In the Republic of Croatia NBS started in 1978, and today screening is performed for nine hereditary metabolic diseases. Screening tests are not diagnostic tests, they indicate newborns who may have a certain metabolic disorder and exclude those who probably do not have these disorders. Laboratories that perform NBS for classic homocystinuria and vitamin B12 deficiency use different procedures. Carrying out an extended NBS using the LC-MS/MS method from a DBS sample implies the analysis of amino acids and acylcarnitine, as primary markers, by derivatized or non-derivatized methods. Due to the large number of false positive results after the analysis of the primary markers C3, C2, Met and Phe for homocystinuria and vitamin B12 deficiency, it is necessary to include more specific second-tier tests (tHcy, MMA) in the procedure. The aim of this paper is to prepare the extension of newborn screening in Croatia for the mentioned diseases. For this purpose, a comparison was made of the six-month results of measuring the analytes of interest (C3, C2, Met and Phe) and their mutual ratios in the NBS of the Croatia with the values of the same analytes used in the procedures of the newborn programs of Austria, Italy, Germany and Spain. It was estimated that by applying the criteria from the procedures of the mentioned countries to the results of the NBS of the Republic of Croatia, for a six-month period, the number of samples for measuring Hcy in the second-tier test would be acceptable for conducting the NBS for homocystinuria and vitamin B12 deficiency in Croatia.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### ***Kriteriji za provođenje drugostupanjskih testova u novorođenačkom probiru na homocistinuriju i nedostatak vitamina B12***

**Ana Begović**

#### **SAŽETAK**

Rijetke bolesti imaju nisku prevalenciju u populaciji, javljaju se u manje od pet pojedinaca na 10 000 osoba i većinom se kasno dijagnosticiraju. Nasljedne metaboličke bolesti su rijetke bolesti koje nastaju kao posljedica smanjene aktivnosti enzima, prijenosnika ili kofaktora. NBS je postupak kojim se organizirano i sustavno otkrivaju urođene bolesti u novorođenačkoj populaciji sa svrhom njihovog pravovremenog prepoznavanja. NBS je u RH započeo 1978., a danas se izvodi probira na devet nasljednih metaboličkih bolesti. Testovi probira nisu dijagnostički testovi, oni upućuju na novorođenačad koja bi mogla imati određeni metabolički poremećaj i isključuju one koji te poremećaje vjerojatno nemaju. Laboratoriji koji provode NBS na klasičnu homocistinuriju i manjak vitamina B12 koriste različite postupnike. Provođenje proširenog NBS-a metodom LC-MS/MS iz uzorka DBS-a podrazumijeva analizu aminokiselina i acilkarnitina, kao primarnih biljega, derivatiziranim ili nederivatiziranim metodama. Zbog velikog broja lažno pozitivnih rezultata nakon analize primarnih biljega C3, C2, Met i Phe na homocistinuriju i manjak vitamina B12, neophodno je u postupnik uvrstiti i specifičnije drugostupanjske testove (tHcy, MMA). Cilj ovog rada je priprema proširenja novorođenačkog probira u RH na navedene bolesti. U tu je svrhu napravljena usporedba šestomjesečnih rezultata mjerenja analita od interesa (C3, C2, Met i Phe) i njihovih međusobnih omjera u NBS-u RH s vrijednostima istih analita koji se koriste u postupnicima novorođenačkih programa Austrije, Italije, Njemačke i Španjolske. Procijenjeno je da bi primjenom kriterija iz postupnika navedenih zemalja na rezultate NBS RH, za šestomjesečno razdoblje, broj uzoraka za mjerenje Hcy u drugostupanjskom testu bio prihvatljiv za provođenje NBS-a na homocistinuriju i manjak vitamina B12 u RH.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 74 stranica, 6 grafičkih prikaza, 12 tablica i 37 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Novorođenački probir, Drugostupanjski testovi, Homocistinurija, Vitamin B12

Mentor: **Prof. dr. sc. Ksenija Fumić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Ksenija Fumić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Doc. dr. sc. Desiree Coen Herak**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Doc. dr. sc. Željka Vogrinc**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: kolovoz 2023.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Criteria for conducting second-tier tests in newborn screening for homocystinuria and vitamin B12 deficiency

Ana Begović

#### SUMMARY

Rare diseases have a low prevalence in the population, they occur in less than five individuals per 10 000 people and are mostly diagnosed late. Inherited metabolic diseases are rare diseases that occur as a result of reduced activity of enzymes, transporters or cofactors. NBS is a procedure for the organized and systematic detection of congenital diseases in the newborn population with the purpose of their timely recognition. In the Republic of Croatia NBS started in 1978, and today screening is performed for nine inherited metabolic diseases. Screening tests are not diagnostic tests, they indicate newborns who may have a certain metabolic disorder and exclude those who probably do not have these disorders. Laboratories that perform NBS for classic homocystinuria and vitamin B12 deficiency use different procedures. Carrying out an extended NBS using the LC-MS/MS method from a DBS sample implies the analysis of amino acids and acylcarnitine, as primary markers, by derivatized or non-derivatized methods. Due to the large number of false positive results after the analysis of the primary markers C3, C2, Met and Phe for homocystinuria and vitamin B12 deficiency, it is necessary to include more specific second-tier tests (tHcy, MMA) in the procedure. The aim of this paper is to prepare the extension of newborn screening in Croatia for the mentioned diseases. For this purpose, a comparison was made of the six-month results of measuring the analytes of interest (C3, C2, Met and Phe) and their mutual ratios in the NBS of the Croatia with the values of the same analytes used in the procedures of the newborn programs of Austria, Italy, Germany and Spain. It was estimated that by applying the criteria from the procedures of the mentioned countries to the results of the NBS of the Republic of Croatia, for a six-month period, the number of samples for measuring Hcy in the second-tier test would be acceptable for conducting the NBS for homocystinuria and vitamin B12 deficiency in Croatia.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 74 pages, 6 figures, 12 tables and 37 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Newborn screening, Second-tier test, Homocystinuria, Vitamin B12

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Desiree Coen Herak, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Željka Vogrinc, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: August 2023.

