

PRACA POGLĄDOWA

# BADANIA PRZESIEWOWE NOWORODKÓW W POLSCE, 2018 ROK

## NEWBORN SCREENING IN POLAND – 2018

✉ MARIUSZ OŁTARZEWSKI

Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej Instytutu Matki i Dziecka w Warszawie



Mariusz Ołtarzewski  
Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki  
Metabolicznej  
Instytut Matki i Dziecka  
ul. Kasprzaka 17A, 01-211 Warszawa  
Tel.: 22 327 71 64,  
mariusz.oltarzewski@imid.med.pl

Wpłynęło: 15.10.2018  
Zaakceptowano: 09.11.2018  
Opublikowano on-line: 15.11.2018

Cytowanie: Ołtarzewski M. Badania przesiewowe noworodków w Polsce, 2018 rok. *Postępy Neonatologii* 2018;24(2):111–122. doi: 10.31350/postepyneonologii/2018/2/PN2018025

Copyright by MAVIPURO Polska Sp. z o.o., Warszawa, 2018. Wszystkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej publikacji nie może być powielana i rozpowszechniana w jakiegokolwiek formie i w jakikolwiek sposób bez zgody wydawcy.

### STRESZCZENIE:

Badania przesiewowe noworodków są uznane przez WHO za ważne działania profilaktyczne. W Polsce pilotażowe badania przesiewowe w kierunku fenyloketonurii rozpoczęto w 1965 roku w Instytucie Matki i Dziecka. Obecnie badania przesiewowe obejmują 29 chorób wrodzonych, w tym fenyloketonurię, wrodzoną niedoczynność tarczycy, mukowiscydozę, wrodzony przerost nadnerczy, deficyt biotynidazy oraz 24 inne wrodzone wady metabolizmu. W ciągu roku takie choroby wrodzone są wykrywane u około 400 noworodków. Badania są wykonywane dla całej populacji noworodków w siedmiu laboratoriach koordynowanych przez Instytut Matki i Dziecka. Program Badań Przesiewowych Noworodków jest finansowany przez Ministerstwo Zdrowia.

**SŁOWA KLUCZOWE:** przesiew, noworodki, metabolizm, steroidy, fenyloketonuria, PKU, WWM

### ABSTRACT:

Newborn Screening is recognized by WHO as an important prophylactic activity. In Poland, newborn pilot screening started in 1965 at the Institute of Mother and Child. Actually 29 diseases are tested, including phenylketonuria, congenital hypothyroidism, cystic fibrosis, congenital adrenal hyperplasia, biotinidase deficiency and 24 additional inborn errors of metabolism. The whole newborn population is tested in 7 laboratories, coordinated by the Institute of Mother and Child. Newborn Screening Program is financed by the Ministry of Health. Nearly 400 newborns are diagnosed thanks to the screening per year.

**KEY WORDS:** screening, newborn, metabolism, steroids, phenylketonuria

## WSTĘP

Populacyjne badania przesiewowe noworodków zostały uznane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO)

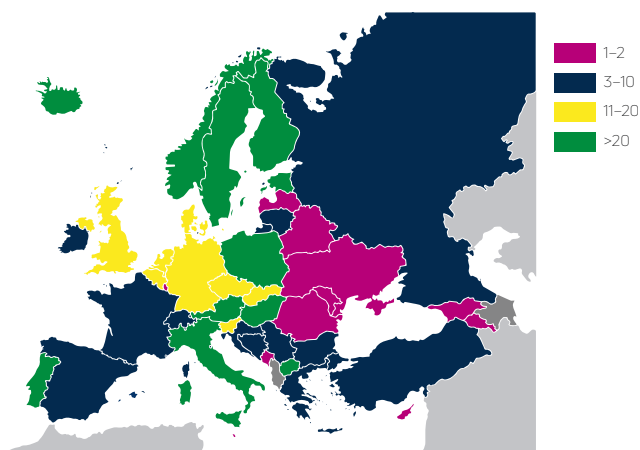
za ważne działanie profilaktyczne, którego celem jest wykrycie i leczenie chorób wrodzonych, stanowiących zagrożenie dla życia dziecka lub prowadzących do zaburzeń rozwoju, ciężkiego przebiegu choroby i często trwałe

niepełnosprawności intelektualnej. W państwach Unii Europejskiej wszystkie noworodki są objęte tymi badaniami. W Polsce badania przesiewowe noworodków są prowadzone w ramach Programu Badań Przesiewowych Noworodków, finansowanego przez Ministerstwo Zdrowia. Głównym wykonawcą jest Instytut Matki i Dziecka. Liczba badanych chorób jest różna w różnych krajach, w Unii Europejskiej jest badanych od dwóch do 30 chorób, w USA do 55 (34 rekomendowane) (ryc. 1). W Polsce obecnie badania przesiewowe noworodków wykonuje się obligatoryjnie w całej populacji, a obejmują one 29 chorób wrodzonych. Badania przesiewowe są bezpłatne, w całości finansowane ze środków Ministerstwa Zdrowia.

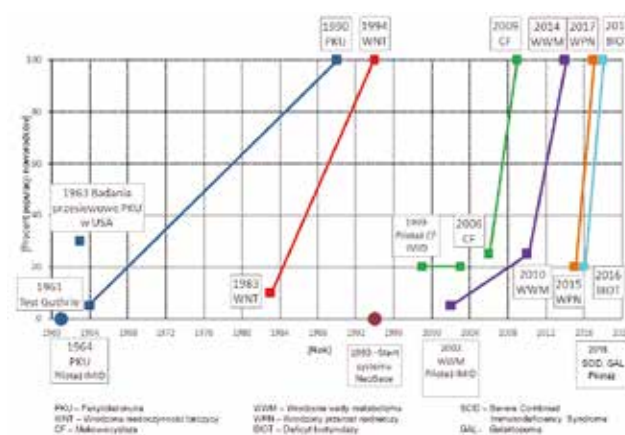
## RYS HISTORYCZNY

Wprowadzenie badań przesiewowych noworodków w kierunku wrodzonych wad metabolizmu (WWM) i innych chorób wrodzonych wiąże się z odkryciem fenylketonurii jako przyczyny zaburzeń rozwoju fizycznego i umysłowego [1]. Fenylketonurię opisał po raz pierwszy w 1934 roku Asbjörn Folling, który zidentyfikował obecność kwasu fenylpirogronowego w moczu dwóch sióstr z ciężką niepełnosprawnością intelektualną i nazwał tę chorobę *imbecillitas phenylpyruvica*, następnie nazwa została zmieniona na fenylketonuria [2]. Później wykazano, że przyczyną fenylketonurii jest całkowity lub częściowy brak aktywności enzymu hydroksylazy fenylalaninowej, metabolizującego fenylalaninę do tyrozyny. Skutkiem tego jest gromadzenie się fenylalaniny we krwi i wydalanie z moczem jej metabolitów, w tym kwasu fenylpirogronowego, który przechodzi w kwas fenylloctowy odpowiadający za charakterystyczny tzw. mysi zapach. Kolejnym krokiem było opracowanie przez Horsta Bickela diety niskofenylalaninowej, której skuteczność opisał w artykule opublikowanym w *Acta Paediatrica* w 1953 roku [3]. Przełomowy dla wprowadzenia populacyjnego badania przesiewowego okazał się test oznaczania fenylalaniny w suchej kropki krwi na bibule, opracowany w 1961 roku przez Roberta Guthrie'ego, nazwany później testem Guthrie'ego. Autor tej metody wykorzystał test mikrobiologiczny i zasadę hamowania wzrostu bakterii *Bacillus subtilis* przez  $\beta$ -2-tienyloalaninę w żelu agarowym na płytce. Czułość testu umożliwiała pobieranie krwi już w 4–5 dobie życia. Pierwsze w świecie badania przesiewowe w kierunku fenylketonurii rozpoczął Robert Guthrie w 1963 roku [1, 2].

W kolejnych latach do badań przesiewowych noworodków dołączono inne choroby wrodzone, w tym galaktozemię, wrodzoną niedoczynność tarczycy, wrodzony przerost nadnerczy, hemoglobinopatie, mukowiscydozę [4-11]. Jednak dopiero wprowadzenie pod koniec lat 90. ubiegłego wieku tandemowej spektrometrii mas (MS/MS)



Ryc. 1. Liczba chorób badanych w Europie. Dane według G. Loeber, ISNS Bratysława, 2018.



Ryc. 2. Badania przesiewowe w Polsce.



Ryc. 3. Laboratoria przesiewowe w Polsce.

umożliwiło objęcie badaniem przesiewowym rzadkich wrodzonych wad metabolizmu, w tym aminoacidopatii, acydurii organicznych i zaburzeń beta oksydacji kwasów tłuszczowych [12]. Obecnie dzięki badaniu MS/MS jest możliwe wykrycie z jednej suchej kropki krwi kilkudziesięciu wad metabolizmu [13-17].

**Tab. 1.** Choroby objęte badaniami przesiewowymi.

Poz.	Choroby objęte badaniami przesiewowymi	Skrót
1	Wrodzona niedoczynność tarczycy	WNT
2	Wrodzony przerost nadnerczy	WPN
3	Mukowiscydoza	CF
4	Fenyloketonuria /hiperfenyloalaninemia	PKU/HPA
5	Choroba syropu klonowego	MSUD
6	Homocystynuria	HCY
7	Cytrulinemia typu I, typu II	CIT I, CIT II
8	Tyrozynemia (prześciowa noworodkowa, typul, typu II, typu III)	TYR I, TYR II
9	Deficyt MCAD	MCADD
10	Deficyt LCHAD	LCHADD
11	Deficyt mitochondrialnego białka trójfunkcyjnego	TFP
12	Deficyt VLCAD	VLCADD
13	Aciduria glutarowa typu II (deficyt wielu dehydrogenaz acylo-Co	GA II (MADD)
14	Deficyt CPT I	CPT I
15	Deficyt CPT II	CPT II
16	Deficyt translokazy karnityny	CACT
17	Deficyt transportera karnityny (pierwotny deficyt karnityny)	CTD/CUD
18	Deficyt liazy 3-hydrokso-3-metyloglutarylo-CoA	HMG
19	Acyduria glutarowa I	GAI
20	Acyduria propionowa	PA
21	Acyduria metylomalonowa	MMA
22	Acyduria izowalerianowa	IVA
23	3-metylokrotonyloglicynuria	MCC
24	Deficyt wielu karboksylaz	MCD
25	Argininemia	(ARG)
26	Acyduria argininowo-bursztynianowa	ASA
27	Deficyt biotynidazy	BIOT
28	Galaktozemia*	GAL
29	Ciężki złożony niedobór odporności*	SCID

\* Badanie w ramach programu EU RareScreen, woj. zachodniopomorskie.

W Polsce badania przesiewowe noworodków, oparte na teście Guthriego, zostały zapoczątkowane przez prof. Barbarę Cabalską i prof. Krystynę Bożkową już w roku 1965 w Instytucie Matki i Dziecka (IMiD). Jednak dopiero pod koniec lat osiemdziesiątych XX wieku cała populacja noworodków została objęta badaniami w kierunku fenyloketonurii (ryc. 2) [18].

Badanie przesiewowe dotyczące wrodzonej niedoczynności tarczycy (WNT) jest prowadzone w IMiD od września 1983 roku, ale dopiero od 1995 roku finansowanie przez Ministerstwo Zdrowia obejmuje całą populację noworodków. Po pilotażowych badaniach w kierunku mukowiscydozy, prowadzonych w latach 1999–2003, w latach 2006–2009 badaniem przesiewowym stopniowo objęto całą Polskę.

W roku 2009 rozpoczęto badania przesiewowe wrodzonych wad metabolizmu (WWM) metodą MS/MS. Na podstawie Programu Badań Przesiewowych na lata 2015–2018 wprowadzono w latach 2015–2016 badanie w kierunku wrodzonego przerostu nadnerczy (WPN), a cała populacja noworodków jest badana od stycznia 2017 roku. W latach 2016–2017 rozpoczęto badania w kierunku deficytu biotynidazy, obejmujące całą populację od stycznia 2018 roku. Obecnie badania przesiewowe są prowadzone w kierunku 29 chorób wrodzonych (tab. 1).

Badania przesiewowe noworodków są bezpłatne, w całości finansowane ze środków Ministerstwa Zdrowia.

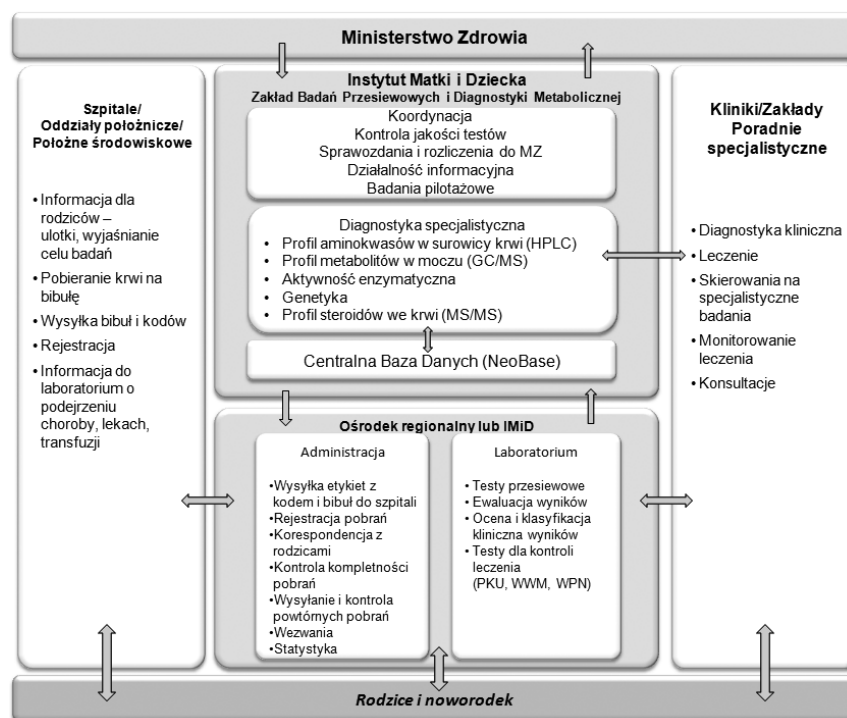
## DLACZEGO PROWADZIMY BADANIA PRZESIEWOWE NOWORODKÓW?

Szereg chorób wrodzonych, zwłaszcza wrodzonych wad metabolizmu, nie daje objawów klinicznych w pierwszych tygodniach, miesiącach, a nawet latach życia. Niektóre z nich, na przykład fenyloketonuria czy wrodzona niedoczynność tarczycy, powodują poważne zaburzenia rozwoju intelektualnego w okresie tworzenia się dróg kojarzeniowych mózgu, dlatego ich objawy nie ujawniają się bezpośrednio po urodzeniu. Patomechanizm neurotoksyczności podwyższonych stężeń fenyloalaniny w fenyloketonurii jest bardzo złożony i wiąże się także z zaburzeniami w metabolizmie neurotransmiterów, szczególnie w dopaminergicznym regionie kory przedczołowej. Natomiast wiele wrodzonych wad metabolizmu ujawnia się nagle, a ich przebieg zagraża zdrowiu, nawet życiu; należą do nich: choroba syropu klonowego (MSUD), acydurie organiczne, np. acyduria glutarowa typu I (GAI), zaburzenia utleniania kwasów tłuszczowych, np. deficyt dehydrogenazy CoA średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych MCAD (z 25% ryzykiem zgonu przy pierwszym epizodzie), deficyt dehydrogenazy 3-hydrokso-acyl-CoA długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCHAD) [14, 15, 19, 20]. W celu uratowania chorych dzieci już od 1963 roku w wielu krajach wprowadzano badania przesiewowe noworodków w kierunku kolejnych chorób wrodzonych. Procedury te umożliwiają bardzo wczesną identyfikację pacjentów, jeszcze w okresie bezobjawowym. Łączna częstość wrodzonych wad metabolizmu i innych chorób, które można wykryć na podstawie przesiewu noworodkowego, wynosi około 1:1000 urodzeń.

## OPIS PROGRAMU

Badania przesiewowe noworodków wykonuje w Polsce siedem laboratoriów, które są wyposażone w aparaturę, sprzęt laboratoryjny i komputerowy oraz specjalistyczne oprogramowanie (ryc. 3). Testy przesiewowe są przeprowadzane

Ryc. 4. Schemat organizacji kompleksowego programu badań przesiewowych.



zgodnie z procedurami opracowanymi w IMiD, który koordynuje badania w całym kraju; są stosowane jednakowe testy diagnostyczne i oprogramowanie komputerowe (NeoBase). Krew do badań jest pobierana od noworodków we wszystkich szpitalach, niezależnie od formy organizacyjnej, a także w przypadku porodów domowych. Na podstawie badań laboratoryjnych noworodki podejrzane o jedną z chorób są wzywane do wytypowanej kliniki lub specjalistycznej poradni. Wszystkie dane matki i noworodka oraz wyniki badań laboratoryjnych są rejestrowane w centralnym rejestrze i archiwizowane zgodnie z wymogami dokumentacji medycznej oraz zabezpieczone zgodnie z ustawą o ochronie danych osobowych RODO. Drugim etapem badań przesiewowych jest diagnostyka potwierdzająca i różnicowa, wykonywana w specjalistycznym laboratorium, oraz ocena kliniczna dokonywana przez specjalistę pediatrii metabolicznej, endokrynologa lub pulmonologa. Trzeci etap, prowadzony w IMiD, obejmuje badania specjalistyczne, kontrolne oraz monitorowanie leczenia, rejestrowane w bazie przesiewowej.

Program badań przesiewowych noworodków wymaga integracji wszystkich komponentów systemu: od pobrania próbki do badań do oceny odległych skutków choroby. Ogólny schemat organizacji nowego modelu kompleksowych badań przesiewowych noworodków przedstawiono na rycinie 4.

## OGÓLNE ZASADY WYKONYWANIA BADAŃ PRZESIEWOWYCH U NOWORODKÓW

System opracowany w IMiD bazuje na komputerowej kontroli wszystkich etapów przesiewu: od pobierania próbek

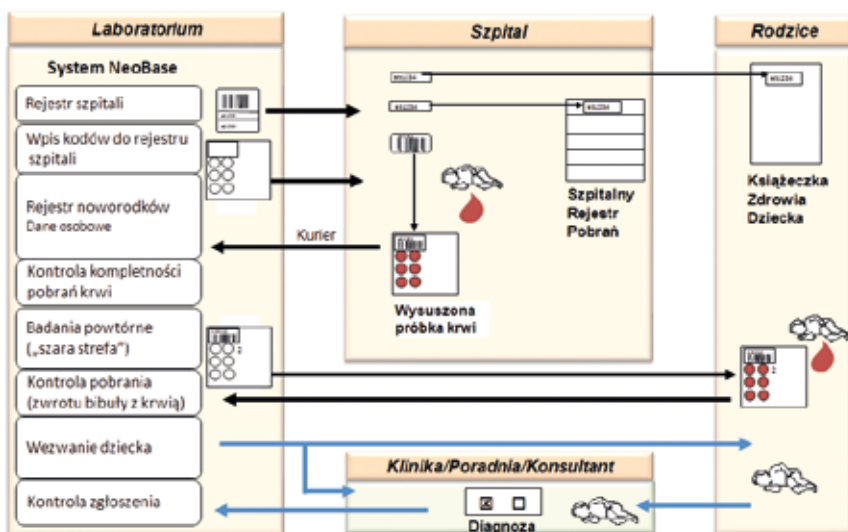
krwi na bibułę aż do finalnej diagnozy lekarza prowadzącego diagnostykę potwierdzającą, a w następnym etapie także badania kontrolne i monitorowanie leczenia (ryc. 5). Podstawą bezpieczeństwa systemu jest stosowanie etykiet z kodem paskowym oraz standardowych bibuły do pobrań, dostarczanych przez producentów zestawów diagnostycznych (ryc. 6).

## ETAPY BADAŃ PRZESIEWOWEGO

### 1. Rejestracja etykiet.

W laboratorium przesiewowym numery etykiet przed ich wysłaniem są przypisywane poszczególnym oddziałom noworodkowym w programie NeoBase. Umożliwia to identyfikację oddziału, na którym pobrano krew. Etykieta składa się z kilku części. Części z kodem paskowym są naklejane na dwie bibuły (z wyjątkiem województw, których komplet testów jest wykonywany w IMiD):

- jedna część odnosi się do testów wykonywanych przez wszystkie laboratoria (WNT, WPN, CF, BIOT);
- druga dotyczy badania WWM metodą MS/MS w IMiD; dane są wpisywane przed pobraniem krwi;
- trzecia jest wklejana do książeczki zdrowia dziecka (zamiast tradycyjnego wpisu) i stanowi dowód pobrania próbki dla rodziców, lekarza lub pielęgniarki w czasie wizyty patronażowej;
- czwarta część etykiety zostaje wklejona do rejestru szpitalnego pobrań krwi do badań przesiewowych. Wszystkie dalsze operacje z pobraną na bibułę próbką krwi dziecka odbywają się pod kontrolą komputera, z automatycznym odczytem kodów paskowych na bibule i na płytkach w testach.



Ryc. 5. Podstawowy schemat badania przesiewowego.



Ryc. 6. Etykieta z kodem.

2. Pobieranie próbek krwi na bibułę.  
Badanie przesiewowe wykonuje się z wysuszonej kropli krwi. Próbkę krwi pobiera się po 48 godzinach od urodzenia, w 3–4 dobie życia, na specjalną bibułę. Wzór bibuły przedstawiono na rycinach 7 i 8.
3. Rejestracja w laboratorium.  
Próbki krwi są rejestrowane w bazie komputerowej. Numery próbek są odczytywane automatycznie z kodów paskowych, co zabezpiecza przed pomyłkami. Zapis obejmuje wszystkie dane z bibuły. Po zarejestrowaniu próbki są przekazywane do analizy.
4. Testy przesiewowe (laboratorium).  
Analizy są wykonywane za pomocą testów ilościowych przeznaczonych do badań przesiewowych, zgodnie z instrukcją producenta. Badanie metodą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) jest wykonywane metodą opracowaną i walidowaną w IMiD. Wszystkie badania podlegają wewnętrznej i międzynarodowej (CDC) kontroli jakości.
5. Powiadomianie i wezwanie dziecka.  
Korespondencja z rodzicami oraz klinikami lub poradniami jest prowadzona automatycznie, za pośrednictwem programu komputerowego, zależnie od oceny

- wyniku testu przesiewowego na podstawie podanych poniżej schematów decyzyjnych oraz konsultacji metabolicznej w przypadku wrodzonych wad metabolizmu. Wezwanie dziecka odbywa się telefonicznie i listownie. Prośba o pobranie nowej próbki (II bibuła) jest wysyłana pocztą wraz z bibułą oznaczoną kodem przypisanym do danego dziecka, dzięki czemu po powrocie do laboratorium II bibuła jest rozpoznawana przez system automatycznie, a wynik przypisywany do rekordu odpowiedniego dziecka.
6. Kontrola komputerowa obiegu próbek i diagnostyki potwierdzającej.  
System NeoBase zapewnia dokładną kontrolę procedury przesiewowej, prowadzoną na podstawie rejestru i nadzoru zwrotu etykiet (próbek krwi), automatycznego śledzenia próbki w laboratorium, kontroli etapów przesiewu od urodzin do wyniku testu oraz diagnozy i rozpoczęcia leczenia, a także kontroli rozkładu dni pobrań i czasu transportu próbek do laboratorium.
  7. Kontrola komputerowa diagnostyki potwierdzającej.  
System NeoBase prowadzi rejestr diagnostyki klinicznej i biochemicznej weryfikującej wynik badania przesiewowego.

Ryc. 7. Awers bibuły do pobrań.

Ryc. 8. Rewers bibuły do pobrań.

## 8. Baza danych, statystyka.

Rejestr noworodków jest oparty na unikatowym identyfikatorze połączonym z numerem PESEL matki, nadawanym w momencie pobierania krwi na bibułę (kod kreskowy). System ten umożliwia gromadzenie innych danych o dziecku, zanim zostanie nadany PESEL, co ma miejsce w drugim lub trzecim miesiącu życia.

Program NeoBase umożliwia podstawowe analizy statystyczne, dotyczące czasu pobierania i częstości wysyłania próbek przez poszczególne szpitale, liczby próbek oraz rozkładu wyników. Możliwa jest statystyka dla każdego oddziału noworodkowego, co ma szczególne znaczenie dla kontroli pobrań i wysyłki próbek krwi do laboratoriów oraz szczegółowej dokumentacji ze względu na obligatoryjność tych badań.

## ALGORYTMY BADAŃ PRZESIEWOWYCH NOWORODKÓW

### WRODZONA NIEDOCZYNNOŚĆ TARCZYCY (WNT)

Badania przesiewowe w kierunku WNT polegają na oznaczaniu stężenia tyreotropiny (TSH) we krwi pobranej na bibułę metodą immunoluminometryczną (ELIA) firmy DiaSorin (ryc. 9) [5, 6]. Wyniki są klasyfikowane w pierwszym etapie jako norma lub podwyższone, zależnie od stężenia TSH. Następnie jeżeli  $TSH \geq 28$  mIU/L, to jest wysyłane wezwanie do zgłoszenia się w najbliższej, wytypowanej poradni lub klinice endokrynologicznej, a dana placówka zostaje powiadomiona o wizycie pacjenta i otrzymuje wynik badania przesiewowego; jeśli  $TSH \geq 12$  mIU/L i  $< 28$  mIU/L, to do rodziców jest wysyłana prośba o powtórne pobranie krwi (tzw. druga bibuła). Każde laboratorium przesiewowe ma listę wytypowanych jednostek endokrynologicznych. Noworodki z przesiewu są przyjmowane bezwzględnie, poza kolejnością.

Badanie	TSH [mIU/L]		
	<12	12–28	$\geq 28$
I wynik	<12	12–28	$\geq 28$
Decyzja	<b>Norma</b>	Druga próbka	<b>Wezwanie</b> Poradnia Endokrynologiczna
II wynik	<12	$\geq 12$	
Decyzja	<b>Norma</b>	<b>Wezwanie</b> Poradnia Endokrynologiczna	

Ryc. 9. Algorytm badania przesiewowego WNT.

### FENYLOKETONURIA (PKU)

Badanie przesiewowe w kierunku fenylketonurii polega na oznaczaniu stężenia fenylalaniny (Phe) i tyrozyny (Tyr) metodą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) oraz stosunku fenylalaniny do tyrozyny (Phe/Tyr), co zwiększa specyficzność testu [1, 12, 21]. Klasyfikację wyniku badania, zależną od stężenia fenylalaniny i stosunku Phe/Tyr, przedstawiono na rycinie 10.

### MUKOWISCYDOZA (CF)

Badania przesiewowe w kierunku mukowiscydozy polegają na oznaczaniu immunoreaktywnego trypsynogenu (IRT) [9]. Algorytm badania przedstawiono na rycinie 10. Ze względu na okresowe wahania poziomu IRT we krwi, związane z porą roku i temperaturą transportu, jako normę przyjęto 99,6 centyla w populacji badanej; wartość ta jest obliczana na podstawie testów wykonanych w ostatnich siedmiu dniach w danym laboratorium. Wszystkie próbki krwi z wartością IRT powyżej normy są kierowane na badanie molekularne mutacji genu CFTR, dlatego jest konieczna zgoda matki i podpis na rewersie bibuły (ryc. 8) [10]. Pierwszy etap badania obejmuje 644 mutacje (sekwencjonowanie wg Sangera), w tym 16 najczęstszych mutacji w populacji polskiej. Następnie, zgodnie z obecnym algorytmem, wszystkie noworodki z jedną lub dwiema mutacjami są wzywane do specjalistycznej kliniki, gdzie jest oznaczane stężenie elektrolitów w pocie. Test ten, mimo że wymaga tylko kilku mikrolitrów potu, może być wykonywany najwcześniej po ukończeniu przez noworodka miesiąca życia. Dla dzieci, u których wykryto jedną mutację w pierwszym badaniu, z tych samych prób krwi jest wykonywane badanie molekularne uzupełniające do całego genu CFTR.

### BADANIE PRZESIEWOWE WRODZONYCH WAD METABOLIZMU (WWM) METODĄ MS/MS

Zastosowanie metody MS/MS umożliwiło objęcie badaniem przesiewowym rzadkich lub bardzo rzadkich

Badanie	Phe [ $\mu$ mol/L] Phe/Tyr		
	Phe<150 Phe/Tyr<1,3	$150 \leq Phe < 360$ $1,3 \leq Phe/Tyr < 2,5$	Phe>360 Phe/Tyr>2,5
I wynik	Phe<150 Phe/Tyr<1,3	$150 \leq Phe < 360$ $1,3 \leq Phe/Tyr < 2,5$	Phe>360 Phe/Tyr>2,5
Decyzja	<b>Norma</b>	Druga próbka	<b>Wezwanie</b> Klinika/Poradnia WWM
II wynik	Phe<150 Phe/Tyr<1,3	Phe $\geq 150$ Phe/Tyr $\geq 1,3$	
Decyzja	<b>Norma</b>	<b>Wezwanie</b> Klinika/Poradnia WWM	

Ryc. 10. Algorytm badania przesiewowego w kierunku PKU – metoda MS/MS.

Badanie	IRT [ng/mL]		
I wynik	<99,4 centyla	>99,4 centyla	
Decyzja		Badanie molekularne 16 najczęstszych mutacji, sekwencjonowanie 8 eksonów genu CFTR	
II wynik	Nie wykryto	1 mutacja	2 mutacje
Decyzja	<b>Norma</b>	Badanie całego genu CFTR oraz <b>Wezwanie</b> Klinika/Poradnia CF	<b>Wezwanie</b> Klinika/Poradnia CF

**Ryc. 11.** Algorytm badania przesiewowego mukowiscydozy (CF).

wrodzonych wad metabolizmu, nie spełniających kryterium częstości występowania w populacji, uzasadniającego prowadzenie przesiewu osobno dla każdej z nich, z wyjątkiem fenylketonurii. W badaniu MS/MS są oznaczane wybrane aminokwasy, acylokarnityny (pochodne od krótkich do bardzo długich kwasów tłuszczowych) oraz wolna karnityna (ryc. 12) [12]. Metoda ta umożliwia wykrycie kilkudziesięciu wrodzonych wad metabolizmu, jednak nie dla wszystkich chorób uzyskuje się wystarczającą czułość (wykrywalność), aby zakwalifikować je do podstawowego pakietu badań. Decyzje w tym zakresie podejmują poszczególne kraje zależnie od strategii przesiewu i możliwości dalszej diagnostyki i leczenia. Obecnie w Polsce badaniem jest objętych 26 wrodzonych wad metabolizmu, w tym acydurowie organiczne oraz inne zaburzenia mechanizmu pośredniego (OA), zaburzenia transportu i beta-oksydacji kwasów tłuszczowych (FAO), a także aminoacidopatie (AA).

Badanie metodą MS/MS umożliwia określenie stężenia kilkudziesięciu markerów (stężeń oraz stosunku stężeń

z jednej próbki, bez prowadzenia uprzednio ich rozdzielania, tak jak to ma miejsce w klasycznej analizie, dlatego metoda ta jest nazywana analizą multipleksową. W badaniu MS/MS są stosowane tzw. wzorce wewnętrzne w postaci izotopu niepromieniotwórczego badanego związku, np. deuterowanej karnityny. Wzorce wewnętrzne umożliwiają analizę ilościową badanych związków.

## WRODZONY PRZEROST NADNERCZY (WPN) – BADANIE DLA CAŁEJ POPULACJI NOWORODKÓW OD 2017 r.

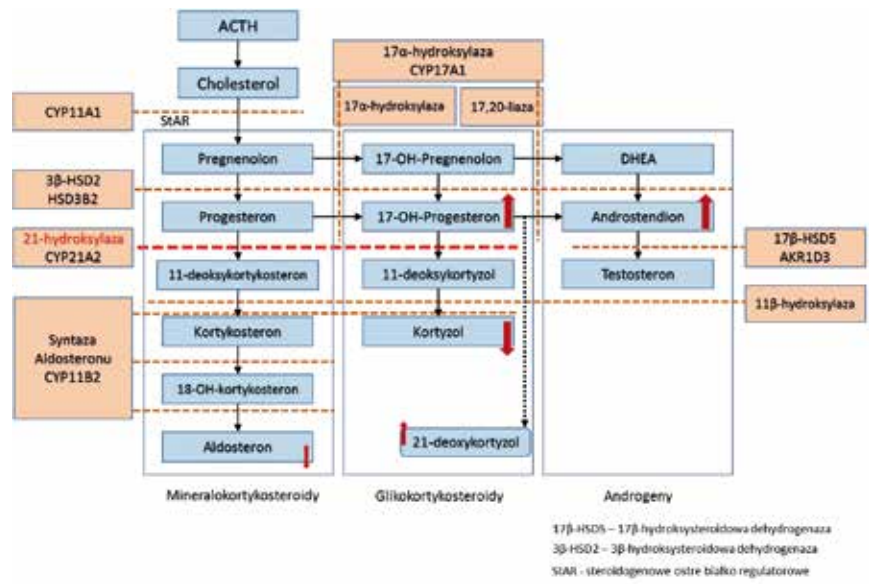
Wrodzony przerost nadnerczy (WPN) jest związany z występowaniem niedoborów enzymatycznych na szlaku biosyntezy hormonów kory nadnerczy. Choroba jest warunkowana genetycznie i jest dziedziczona autosomalnie recesywnie. Najczęściej niedobór enzymatyczny dotyczy 21-hydroksylazy, znacznie rzadziej zależy od niedoboru innych enzymów steroidogenezy (11-hydroksylazy, dehydrogenazy 3 $\beta$ -hydroksysteroidowej, 17-hydroksylazy) [8]. Zaburzenia te prowadzą do niedostatecznego wytwarzania kortyzolu, a w konsekwencji do nadmiaru ACTH, przerostu kory nadnerczy i znacznego nadmiaru androgenów nadnerczowych (ryc. 13).

Niedobór 21-hydroksylazy może przebiegać klinicznie w formie ciężkiej (klasycznej) i łagodnej (nieklasycznej). Forma klasyczna WPN jest zaburzeniem dynamicznie zmieniającym się w czasie, nieraz powodującym szybkie pogarszanie się stanu dziecka. Dlatego dla badania przesiewowego istotna jest ocena kliniczna noworodka oraz wszelkie dane mogące sugerować istnienie choroby. Ważne jest, aby w razie stwierdzenia u noworodka nieprawidłowości w wyglądzie narządów płciowych lub typowych zaburzeń w jonogramie (hiperkalemia, hiponatremia) umieścić taką uwagę na bibule i powiadomić bezzwłocznie laboratorium przesiewowe. Ważne jest również podanie informacji

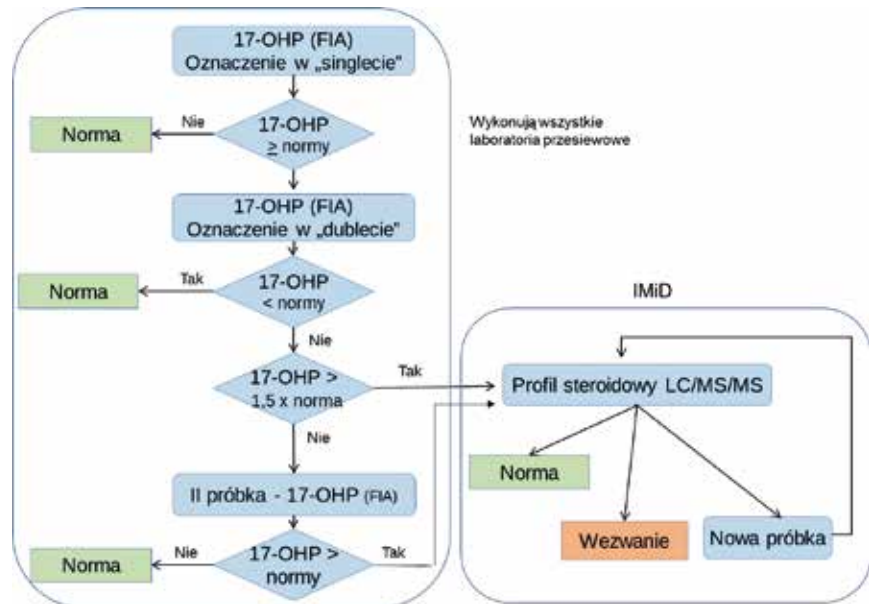
Badanie	Profil aminokwasów i acylokarnityn i wolnej karnityny			
	Analiza profilu 92 parametry			
I wynik	Wszystkie stężenia i stosunki stężeń w normie?			
Ocena	Tak	Nie		
	<b>Norma</b>	Ocena metaboliczna profilu		
Decyzja		<b>Wezwanie</b> do specjalisty pediatrii metabolicznej	Powtórzenie z nowej próbki krwi	
II wynik			<b>Wezwanie</b> do specjalisty pediatrii metabolicznej	<b>Norma</b>
		<b>W IMiD badanie:</b> profilu metabolitów w moczu (GC/MS), profilu aminokwasów w surowicy (HPLC), aktywności wybranych enzymów, Genetyka		

**Ryc. 12.** Algorytm badania przesiewowego wrodzonych wad metabolizmu (WWM) metodą MS/MS.

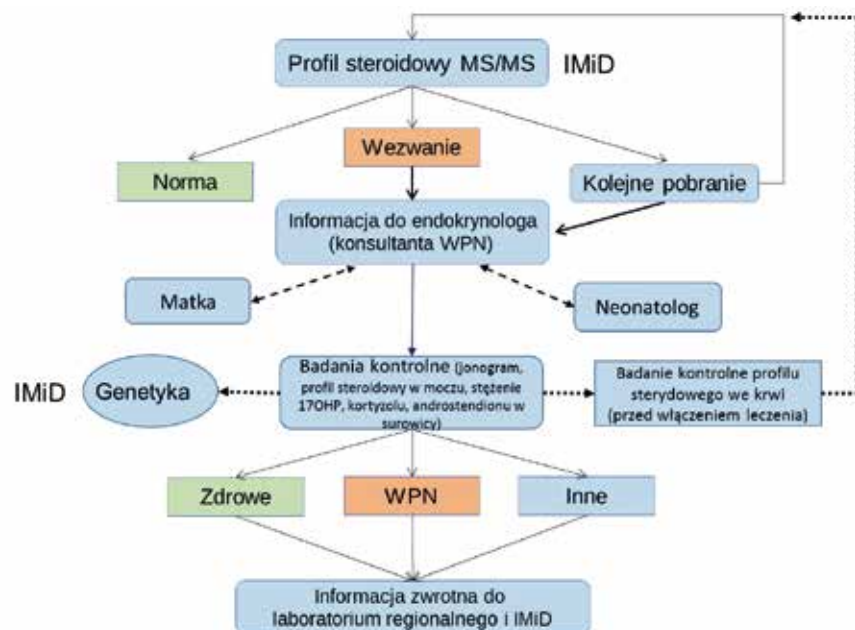
Ryc. 13. Steroidogeneza hormonów nadnerczy.



Ryc. 14. Algorytm badania przesiewowego WPN – etap I.



Ryc. 15. Algorytm badania przesiewowego WPN – etap II.





o istnieniu WPN w rodzinie. W takich przypadkach oba badania hormonalne (17-OHP metodą FIA oraz profil steroidowy metodą LC/MS/MS) wykonuje się jednocześnie, aby jak najszybciej potwierdzić lub wykluczyć chorobę.

Badania przesiewowe prowadzi się w celu wykrycia u noworodka klasycznej formy WPN, (jeszcze przed wystąpieniem objawów zespołu utraty soli) oraz rozpoczęcia właściwego leczenia hormonalnego, zapewniającego prawidłowy wzrost i rozwój dziecka. Są one także pomocne w ustaleniu płci w razie wątpliwości, pomagają uniknąć błędów. Częstość występowania szacuje się na 1:10000–16000. Badanie w kierunku WPN jest dwuetapowe, o złożonym algorytmie, przedstawionym na rycinach 14 i 15.

Podczas pierwszego etapu oznacza się w regionalnym laboratorium przesiewowym poziom 17-hydroksyprogesteronu (17-OHP) metodą immunofluorymetryczną (FIA) z kropli krwi na bibule [22]. Wynik porównuje się z normą zależną od czasu trwania ciąży i wieku dziecka w chwili pobrania krwi. Zależność rozkładu poziomu 17-OHP od czasu trwania ciąży ilustruje skumulowany rozkład stężeń 17-OHP (ryc. 16).

Dopiero w następnej kolejności w Zakładzie Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej IMiD dla prób o stężeniu 17-OHP (FIA) powyżej normy wykonuje się z tej samej próbki krwi badanie profilu steroidów metodą tandemowej spektrometrii mas (LC/MS/MS). Oznaczane są: 17-hydroksyprogesteron (17-OHP), androstendion (4-A), kortyzol (F), 11-deoksykortyzol (S), a także 21-deoksykortyzol (21-F) – nietypowy produkt steroidogenezy, powstający przez 11-beta-hydroksylację nadmiarowego 17-OHP. Podwyższone stężenie 17-OHP, androstendionu oraz 21-deoksykortyzolu a obniżone kortyzolu może przemawiać za rozpoznaniem choroby. Wyniki mniej charakterystyczne lub niejednoznaczne wymagają weryfikacji przy użyciu próbki krwi z kolejnej bibuły.

Badanie profilu steroidów zwiększa istotnie wartość predykcyjną badania, zwłaszcza u dzieci urodzonych

przedwcześnie i/lub z niską masą ciała, w tej bowiem grupie stwierdza się znaczny odsetek wyników fałszywie dodatnich ze względu na częsty, niezwiązany z WPN, podwyższony poziom 17-OHP oraz androstendionu we krwi, bez obniżenia się poziomu kortyzolu. W tym przypadku istotnym steroidem różnicującym jest 21-deoksykortyzol, który występuje przede wszystkim u dzieci z WPN [23-25]. Dlatego szczególnie u wcześniaków jest zalecane powtarzanie badania profilu z kolejnych bibuł oraz analiza dynamiki zmian poziomu steroidów w kolejnych tygodniach życia.

Informacja o dodatnich wynikach badania 17-OHP metodą FIA oraz badania profilu steroidowego, wskazujących na występowanie u noworodka wrodzonego przerostu nadnerczy, jest przekazywana niezwłocznie przez laboratorium wyznaczonemu dla danego województwa konsultantowi (endokrynologowi), który organizuje i pilotuje dalsze postępowanie diagnostyczno-lecznicze w warunkach szpitalnych w województwie zgodnym z miejscem zamieszkania dziecka. W przypadkach niejednoznacznego obrazu klinicznego i biochemicznego mogą być wykonane badania genetyczne (molekularne). Po potwierdzeniu rozpoznania WPN i podjęciu leczenia ośrodek leczący informuje zwrótnie o tym fakcie laboratorium przesiewowe.

W Polsce w badaniach przeprowadzonych w latach 2016–2018 u 990.372 noworodków częstość WPN wyniosła 1:14781. WPN wykryto u 38 chłopców i 29 dziewczynek, natomiast nie zgłoszono wirylizacji u sześciu dziewczynek, w tym dwa przypadki były zarejestrowane w dokumentacji szpitalnej.

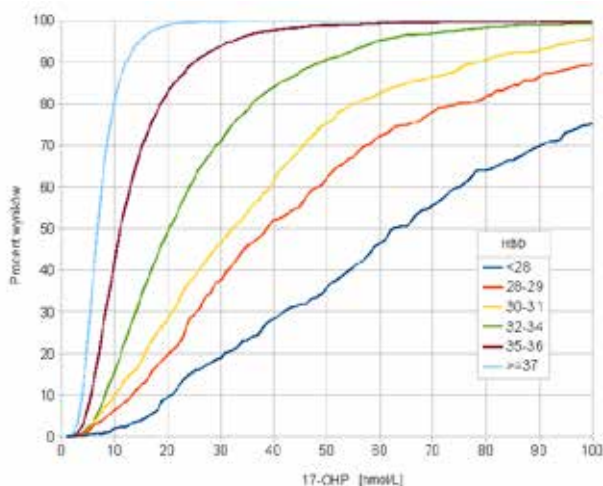
## DEFICYT BIOTYNIDAZY (BADANIE PRZESIEWOWE OD 1.01.2018 ROKU DLA CAŁEJ POPULACJI)

Deficyt (niedobór) biotynidazy to wrodzona wada metabolizmu biotyny (zwanej witaminą H lub B7), nieleczona objawia się drgawkami, trudnościami w oddychaniu, hipotonią, wysypką skórą, łysieniem, utratą słuchu, opóźnieniem rozwoju. Choroba może się objawić w pierwszych miesiącach życia noworodka, ale jest możliwe również wystąpienie jej w późniejszym okresie. Wykrycie choroby w badaniu przesiewowym umożliwia leczenie przez podawanie wolnej biotyny i zapewnia prawidłowy rozwój. Częstość deficytu biotynidazy to około 1:60000 urodzeń.

Badanie przesiewowe polega na oznaczaniu testem fluorymetrycznym aktywności biotynidazy po ekstrakcji z suchej kropli krwi (ryc. 17) [26].

## DIAGNOSTYKA SPECJALISTYCZNA I MONITOROWANIE

Po badaniu populacyjnym kolejnym etapem przesiewu jest ustalenie ostatecznego rozpoznania oraz rozpoczęcie



Ryc. 16. Poziom 17-OHP zależnie od czasu trwania ciąży.

Badanie	Oznaczenie aktywności biotyny nmol/min/dL	
I wynik	>30	<30
Decyzja	Norma	Druga próbka
II wynik	>15	<15
Decyzja	Norma	Wezwanie Poradnia WWM

Ryc. 17. Algorytm badania przesiewowego w kierunku deficytu biotynidazy.

właściwego leczenia, monitorowanego w dłuższym okresie. Zgodnie z definicją badań przesiewowych noworodków celem jest wczesne wykrycie choroby, co zapobiega lub znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia poważnych powikłań, a więc również redukuje częstość zgonów noworodków. Analiza tych wskaźników oraz przebiegu choroby wykrytej w przesiewie umożliwia całkowitą ocenę efektywności programu. O skuteczności programu badań przesiewowych świadczy więc nie tylko liczba rozpoznanych przypadków wrodzonych wad metabolizmu, ale przede wszystkim zapobieganie klinicznemu ujawnieniu się choroby wraz z jej odległymi skutkami. Dlatego program badań przesiewowych, umożliwiając wczesne wykrycie choroby, wymaga sprawnie działającego systemu, który obejmuje również badania potwierdzające dane podejrzenie, a także zapewnia monitorowanie leczenia w ramach zarówno krótkoterminowej obserwacji w pierwszych latach życia, jak i długoterminowej, tj. w całym wieku rozwojowym.

Zintegrowany program badań przesiewowych (ryc. 2) obejmuje:

- badania przesiewowe: pobranie krwi, transport, rejestrację, wykonanie badań laboratoryjnych, ocenę wyników;
- diagnostykę biochemiczną i kliniczną weryfikującą dodatni wynik badania przesiewowego;
- ostateczne rozpoznanie wady i określenie niezbędnego postępowania terapeutycznego, konsultację specjalisty pediatrii metabolicznej, endokrynologa lub pulmonologa, poinformowanie rodziny o chorobie;
- wstępne zalecenia dotyczące terapii, monitorowania choroby oraz kompleksowej opieki wielospecjalistycznej;
- prospektywną analizę wyników badań przesiewowych (wczesnego rozpoznania oraz krótko- i długoterminowego przebiegu choroby).

W badaniach przesiewowych szczególna odpowiedzialność spoczywa na lekarzach i pielęgniarzach oddziałów położniczych: pobierają oni krew na bibułę od ponad 30 000 noworodków miesięcznie, ponadto dostarczają dodatkowych, ważnych dla badań informacji, w tym o podejrzeniu choroby wrodzonej, co jest szczególnie istotne w badaniu przesiewowym WPN oraz WWM, ponieważ może znacznie przyspieszyć diagnozę. Natomiast dobrze zorganizowane laboratorium przesiewowe jest bezdyskusyjnym warunkiem właściwego przeprowadzania badań przesiewowych.

W przypadku wrodzonych wad metabolizmu obecność nieprawidłowych metabolitów w badaniu przesiewowym noworodka może mieć podłoże wtórne, związane tylko z zaburzeniami z okresu prenatalnego lub okołoporodowego, takimi jak: wcześniactwo, niska urodzeniowa masa ciała, sposób żywienia, stosowane leki, schorzenia u matki. Niezbędne jest wówczas powtórzenie analiz i/lub przeprowadzenie dodatkowych testów. W przypadku podejrzenia wrodzonej wady metabolizmu jest konieczne wykonanie dodatkowych badań biochemicznych, takich jak:

- profil kwasów organicznych w moczu metodą chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią masową (GC-MS);
- oznaczenie stężenia aminokwasów metodą ilościową w osoczu;
- oznaczenie aktywności enzymu, którego niedobór jest podstawą rozpoznania choroby;
- badania molekularne – zidentyfikowanie mutacji patogennych w analizie DNA (konieczne do ostatecznego potwierdzenia rozpoznania).

Badania te są wykonywane bezpłatnie w IMiD w ramach środków przeznaczonych przez Ministerstwo Zdrowia na realizację Programu Badań Noworodków w Polsce.

Po ustaleniu rozpoznania choroby wykrytej w przesiewie noworodkowym na podstawie wyników powyżej wymienionych badań specjalista pediatrii metabolicznej (lub lekarz pediatra w porozumieniu ze specjalistą) określa wskazania co do trybu leczenia (natychmiastowa czy pilna hospitalizacja), udziela informacji rodzicom pacjenta o specyfice choroby i zaplanowanym postępowaniu. Realizacja zaleceń wymaga długoterminowego monitorowania, obejmującego regularne kontrole kliniczne, dietetyczne i biochemiczne.

## CZYNNIKI WPŁYWAJĄCE NA FAŁSZYWY WYNIK TESTU

1. Złe pobranie próbek krwi (zbyt mało, nierównomiernie, bez kompletnego przesączenia) lub źle wysuszona krew, zanieczyszczenie próbek (pieczętki, długopis).
2. Transfuzja – konieczna informacja o stosowanym preparacie.
3. Antykoagulanty (EDTA, cytryniany).
4. Podanie steroidów, zwłaszcza kortykosteroidów (w tym prenatalnie) – przesiew WPN!
5. Podanie glukozy – może spowodować prawidłowy wynik w zaburzeniach beta-oksydacji.
6. W przesiewie deficytu biotynidazy fałszywe obniżenie aktywności: gammaglobuliny >1,5 g/dL, triglicerydy – Intralipid >150 mg/dL oraz biotyna (500 mg/dL); fałszywe podwyższenie aktywności: utrzymujące się poziomy albuminy powyżej

normy (2,8–4,4 g/dL) oraz siarczan kanamycyny, glutation, sulfametoksazol i trimetoprim.

## O CZYM NALEŻY PAMIĘTAĆ

1. Wezwanie dziecka do kliniki lub poradni przez ośrodek przesiewowy już po badaniu pierwszej próbki krwi następuje w przypadku znacznego prawdopodobieństwa choroby (50–90%), konieczna jest bezwzględna konsultacja specjalisty oraz dalsze badania specjalistyczne.
2. Prośba o powtórne pobranie krwi oznacza wynik powyżej normy, ale w tzw. szarej strefie, co świadczy o mniejszym prawdopodobieństwie potwierdzenia choroby, lecz jej nie wyklucza.
3. Wezwanie po powtórnych badaniach prób krwi najczęściej oznacza utrzymywanie się stężenia nieprawidłowych markerów powyżej normy, o mniejszym prawdopodobieństwie choroby i wymaga dalszej diagnostyki.
4. Badanie przesiewowe nie jest diagnozą. Badanie to również nie wyklucza choroby objętej przesiewem, ponieważ w każdym systemie zdarzają się błędy, w tym: brak pobrania próbki krwi (w Polsce jest badane blisko 99,9% populacji), pobranie próbki od innego dziecka (niestety zdarza się!), błąd laboratoryjny (niezwykle mało prawdopodobny w obecnym systemie), tzw. błąd biologiczny – u chorego dziecka badany marker jest w normie. Ostatni wariant dotyczy zwłaszcza tych wad metabolizmu, w których w stanie wyrównania metabolicznego stężenia markerów mogą być w normie, np. w zaburzeniach beta-oksydacji kwasów tłuszczowych (deficyt MCAD, LCHAD).
5. W badaniu przesiewowym są wykrywane także dzieci, u których pomimo potwierdzenia wady metabolizmu przez długi okres, czasami przez całe życie, nie występują objawy choroby. Konieczne jest przekonanie rodziców, że przestrzeganie zaleceń specjalisty i poddanie dziecka długotrwałej obserwacji jest niezbędne i może ochronić dziecko w przypadku wystąpienia nagłej kryzy metabolicznej.
6. W badaniach szczególnie grupę, trudną diagnostycznie i terapeutycznie, stanowią pacjenci z resztkową aktywnością enzymatyczną, która może dawać bardzo łagodny przebieg choroby. W tym zakresie nadal nie ma jednoznacznego stanowiska specjalistów.

## PODSUMOWANIE

Efekt społeczny i korzyść ekonomiczna badań przesiewowych noworodków są niekwestionowane. Koszt wykrycia

jednego dziecka chorego w badaniu przesiewowym odpowiada kosztom utrzymania osoby z niepełnosprawnością intelektualną w specjalistycznym zakładzie opieki przez okres 2–3 lat. Dzieci chore wykryte w badaniach przesiewowych i wczesnie leczone uzyskują prawidłowy rozwój psychiczny i fizyczny i/lub znaczną poprawę jakości życia. W ciągu roku jest wykrywanych ponad 300 noworodków z chorobami wrodzonymi.

Realizacja i poszerzenie badań przesiewowych pasuje Polskę w grupie krajów rozwiniętych, w których badaniami przesiewowymi są objęte całe populacje noworodków. W dalszych latach są konieczne prace nad optymalizacją systemu, czyli skróceniem czasu od pobrania krwi do rejestracji w laboratorium oraz objęciem badaniami przesiewowymi chorób, które już są badane w innych krajach Unii Europejskiej, jak np. galaktozemia (GAL) i ciężki wrodzony niedobór odporności (SCID) [27–31] oraz inne wady metabolizmu. Badanie pilotażowe SCID i GAL jest prowadzone w ramach europejskiego programu transgranicznego „Rare-Screen”, w którym partnerami są: Uniwersytet w Greifswaldzie i Charite w Berlinie, a w Polsce Pomorski Uniwersytet Medyczny, IMiD i CZD. Należy pamiętać, że warunkiem włączenia do badań przesiewowych każdej choroby jest nie tylko istnienie specyficznego testu, ale również możliwość zapewnienia diagnostyki oraz leczenia – to jest kryterium obejmujące koszt całkowity, który w przypadku niektórych chorób może stanowić barierę nie do pokonania w danym kraju.

KONFLIKT INTERESÓW: nie zgłoszono.

## PIŚMIENNICTWO

1. Guthrie R, Suzi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in a large population of newborn infants. *Pediatrics* 1963;32(3):338.
2. Koch AJH. Robert Guthrie the PKU Story. Hope Publishing House, 1997.
3. Bickel H. Early diagnosis of phenylketonuria. *Monatsschr Kinderheilkd* 1966;114(1):23–25.
4. Pasquali M, Yu C, Coffee B. Laboratory diagnosis of galactosemia: a technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 2018;20(1):3–11 [doi: 10.1038/gim.2017172].
5. Leger J, Olivieri A, Donaldson M i wsp. European Society for Paediatric Endocrinology Consensus Guidelines on Screening. Diagnosis and management of congenital hypothyroidism. *J Endocrinol Metab* 2014;99(2):363–384 [doi: 10.1210/jc.2013-1891].
6. Lazarus J, Brown R, Daumerie CH i wsp. European Thyroid Association guidelines for management of subclinical hypothyroidism in pregnancy and children. *Eur Thyroid J* 2014;3:76–94 [doi: 10.1159/000362597].
7. Toshihiro Tajima, Masaru Fukushi. Neonatal mass screening for 21-hydroxylase deficiency. *Clin Pediatr Endocrinol* 2016;25(1):1–8 [10.1297/cpe.25.1].
8. Speiser PW, Azziz R, Baskin LS i wsp. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4133–4160 [doi: 10.1210/jc.2009-2631].

9. Farrell PM, Mischler EM. Newborn screening for cystic fibrosis. *Adv Pediatr* 1992;39:35–70.
10. Sobczyńska-Tomaszewska A, Ołtarzewski M, Czerna K i wsp. Newborn screening for cystic fibrosis: polish 4 years' experience with CFTR sequencing strategy. *Eur J Human Genet* 2012;1–6.
11. Hale JE, Parad RB, Dorkin HL i wsp. Cystic fibrosis newborn screening: using experience to optimize the screening algorithm. *J Inher Met Dis* 2010;33(Suppl. 2):S255–S261 [doi: 10.1007/s10545-010-9117-3].
12. Chace DH, Naylor EW. Expansion of newborn screening programs using automated tandem mass spectroscopy. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 1999;5(2):150–154.
13. Pronicka E, Ołtarzewski M, Gradowska W i wsp. Skrining selektywny w kierunku wrodzonych wad metabolizmu – rola badania profilu kwasów organicznych w moczu metodą GC-MS oraz badania profilu acylokarnityny i aminokwasów w suchej kropli krwi metodą MS/MS. *Pediatrics Polska* 2003;78(4):265–271.
14. Wilcken B. Fatty acid oxidation disorders: outcome and long-term prognosis. *J Inher Met Dis* 2010;33(5):501–506 [doi: 10.1007/s10545-009-9001-1].
15. Lindner M, Hoffmann GF, Matern D. Newborn screening for disorders of fatty-acid oxidation: experience and recommendations from an expert meeting. *J Inher Met Dis* 2010;33(5):521–526 [doi: 10.1007/s10545-010-9076-8].
16. Wilcken B, Haas M, Joy P i wsp. Expanded newborn screening: outcome in screened and unscreened patients at age 6 years. *Ped* 2009;124:e241–e249.
17. Wilcken B. Expanded newborn screening: reducing harm, assessing benefit. *J Inher Met Dis* 2010;33(Suppl. 2):S205–S210 [doi: 10.1007/s10545-010-9106-6].
18. Cabalska B i wsp. Longitudinal study on early diagnosis and treatment of phenylketonuria in Poland. *Eur J Pediatr* 1966;155(Suppl. 1):S53.
19. Viau K, Ernst SL, Vanzo RJ i wsp. Glutaric acidemia type 1: Outcomes before and after expanded newborn screening. *Mol Genet Metab* 2012;106(4):430–438 [doi: 10.1016/j.ymgme.2012.05.024].
20. Sykut-Cegielska J, Gradowska W, Piekut-Abramczuk D i wsp. Urgent metabolic service improves survival in Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (LCHAD) deficiency detected by symptomatic identification and pilot newborn screening. *J Inher Metab Dis* 2011;34:185–195.
21. van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K i wsp. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis* 2017;12(1):162 [doi: 10.1186/s13023-017-0685-2].
22. Hayashi GY, Carvalho DF, de Mirnada MC i wsp. Neonatal 17-hydroxyprogesterone levels adjusted according to age at sample collection and birthweight improve the efficacy of congenital adrenal hyperplasia newborn screening. *Clin Endoc* 2017;86(4):480–487 [doi: 10.1111/cen.13292].
23. Janzen N, Sander S, Terhardt M i wsp. Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spot using UPLC liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroids* 2011;76:1437–1442.
24. Boelen A, Endert E, Claahsen-van der Grinten H, Ackermans M. Determination of a steroid profile in heel prick blood using LC-MS/MS. *Bioanal* 2016;8(5):357–384.
25. Fiet J, Le Bouc Y, Guéchet J i wsp. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry profile of 16 serum steroids, including 21-deoxycortisol and 21-deoxycortisol and 21-deoxycorticosterone, for management of congenital adrenal hyperplasia. *J Endocr Soc* 2017;1(3):186–201 [doi: 10.1210/js.2016-1048].
26. Cowan TM, Blitzer MG, Wolf B. Technical standards and guidelines for the diagnosis of biotinidase deficiency. *Genet in Med* 2010;12(7):464–470 [doi: 10.1097/GIM.0b013e3181e4cc0f].
27. Samedi VM, Shefey A, AlAwad E, Faveta LM. Immunological emergency in neonate: case report and role of early screening. *Am J Perinatol Rep* 2018;8:e134–e137.
28. Borte S, Von Döbeln U, Fasth A i wsp. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood* 2012;119(11):2552–2555 [doi: 10.1182/blood-2011-08-371021].
29. Barbaro M, Ohlsson A, Borte S i wsp. Newborn screening for severe primary immunodeficiency diseases in Sweden – a 2-year pilot TREC and KREC screening study. *J Clin Immunol* 2017;37(1):51–60 [doi: 10.1007/s10875-016-0347-5].
30. Audrain MAP, Léger AJC, Hémond CAF i wsp. Newborn screening for severe combined immunodeficiency: analytic and clinical performance of the T cell receptor excision circle assay in France (DEPISTREC Study). *J Clin Immunol* 2018;38(7):778–786 [doi: 10.1007/s10875-018-0550-7].
31. Blom M, Pico-Knijnenburg I, Sijne-van Veen M i wsp. An evaluation of the TREC assay with regard to the integration of SCID screening into the Dutch newborn screening program. *Clin Immunol* 2017;180:106–110 [doi: 10.1016/j.clim.2017.05.007].